

**UNTERSUCHUNGEN
ZUR GENETIK UND PHYSIOLOGIE DER SENESZENZ
DES ASCOMYCETEN PODOSPORA ANSERINA**

DISSERTATION

zur

Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
der

Abteilung für Biologie
an der Ruhr-Universität Bochum

von

PAUL-W. TUDZYNSKI
aus Fluorn

Bochum 1978

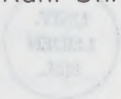
**UNTERSUCHUNGEN
ZUR GENETIK UND PHYSIOLOGIE DER SENESZENZ
DES ASCOMYCETEN PODOSPORA ANSERINA**

DISSERTATION

zur

Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
der

Abteilung für Biologie
an der Ruhr-Universität Bochum



von

PAUL-W. TUDZYNSKI

aus Fluorn

Bochum 1978



1. Referent: Prof.Dr. K. Esser

2. Referent: Prof. Dr. W. Scheuermann

Eingereicht am: 19.6.78

Tag der mündlichen Prüfung: 25.8.78

Herrn Prof.Dr. Karl Esser, meinem Lehrer und Doktorvater, danke ich herzlich für seine großzügige Unterstützung und Förderung meiner Arbeit in allen Bereichen.

Mein besonderer Dank gilt Frau U.Rojek und Frau H.Hüsemann, die durch ihren unermüdlichen Einsatz die technische Durchführung dieser Untersuchungen ermöglicht haben, ferner allen anderen Mitarbeitern des Lehrstuhls für Allgemeine Botanik, die mir technische Unterstützung gewährt haben, besonders Herrn E.Konopka, Frau C.Krczezowiak, Fräul.I.Grubbert und Herrn H.Rathke.

Frau J.Jobusch möchte ich herzlich danken für die "Bemutterung" im ersten Jahr meiner Arbeit.

Meinen Kollegen, den Herren Dr.U.Stahl, F.Meinhardt, W.Minuth und U.Kück schulde ich Dank für ihre Bereitschaft zu Diskussionen, für viele Anregungen und auch für manche Korrektur.

Frau Prof.Dr.D.Marcou, Paris, danke ich für die Einführung in mikrochirurgische Techniken.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (Bonn-Bad Godesberg) finanzierte Geräte eingesetzt.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546403_0031

Untersuchungen zur Genetik und Physiologie der Seneszenz
des Ascomyceten *Podospora anserina*

<u>Inhaltsverzeichnis</u>	<u>Seite</u>
I. Einführung	
A. Erscheinungsformen und Ursachen des Alterns	1
B. Seneszenz bei <u><i>Podospora anserina</i></u>	4
C. Seneszenzerscheinungen bei anderen Pilzen	14
II. Problemstellung	19
III. Material und Methoden	21
IV. Ergebnisse	
A. Genetische Untersuchungen	
1. Einführung	25
2. Erbfaktoren mit lebensverlängernder Wirkung	
a) Charakterisierung der untersuchten Mutanten	26
b) Lebensdauer von Einzel- und Doppelmutanten	31
3. Untersuchungen an der Doppelmutante <u>i viv</u>	
a) Genetische "Probenahme" bei Langwuchs	36
b) Infektionsversuche	40
c) Ausprägung im Heterokaryon	43
4. Zusammenfassung	45
B. Physiologische Untersuchungen	
1. Einführung	46
2. Inhibitorversuche	
a) Screening von Inhibitoren mit positivem Einfluß auf die Lebensdauer	48
b) Einfluß des Myzelalters auf die Inhibitorwirkung	58
c) Therapieversuche	60
d) Zusammenfassung	64

	<u>Seite</u>
3. Untersuchungen an Protoplasten	
a) Einführung	65
b) Wuchspotentialanalyse mit Hilfe von Protoplasten	67
c) Infektionsversuche	72
d) Therapieversuche	77
4. Untersuchungen zur Katabolitrepression	78
V. Diskussion	86
VI. Zusammenfassung	100
VII. Literaturverzeichnis	
VIII. Anhang	
A. Vorveröffentlichungen	
B. Lebenslauf	

Abkürzungen

c - AMP :	3'-5'-cyclisches - Adenosinmonophosphat
DNA :	Desoxyribinukleinsäure
EDTA :	Äthylendiamintetraazetat
Inos. :	Inositol
Leu. :	Leucin
mt :	mitochondrial
RNA :	Ribonukleinsäure
SDS :	Natrium-Dodecylsulfat
SSC :	Standard Saline Citrate
Tris :	Tris (hydroxymethyl)- aminomethan
t-RNA :	transfer - Ribonukleinsäure

I. Einführung

A. Erscheinungsformen und Ursachen des Alterns :

Seneszenz oder Altern ist ein allgemeines biologisches Grundphänomen, dem fast alle Organismen unterworfen sind. Es kann definiert werden als eine Abnahme des Wuchs - und meist auch des Fortpflanzungspotentials, an deren Ende der Tod der Einzelzelle oder des Organismus steht. Die Erscheinungsformen der Alterung sind sehr vielfältig: bei einigen Organismengruppen, wie z.B. Bakterien und Ciliaten, ist das Auftreten von Seneszenzsymptomen nicht die Regel, sondern ist an bestimmte Umweltbedingungen gebunden; bei höheren Organismen dagegen ist Seneszenz ein unausweichlicher und in den meisten Fällen exakt determinierter Vorgang, der von Außenbedingungen nur unwesentlich beeinflusst werden kann.

Auch die Symptome der Alterung sind bei den einzelnen Organisationsstufen sehr unterschiedlich, wie die folgenden Beispiele zeigen:

(1) Bei Säugetieren läßt sich die Seneszenz in vivo nur schwer exakt untersuchen; sie scheint vor allem durch Degenerationserscheinungen im Bereich des Nerven- und Immunsystems bedingt zu sein (Platt 1976).

Die Untersuchungen von Hayflick (1961, 1965) haben aber gezeigt, daß Säugetierzellen auch in Kultur eine definierte Lebensdauer haben. Bei diesen Zellen tritt (je nach Herkunft) nach 40 - 50 Zellteilungen eine Verzögerung des Wachstums, ein Verlust der Fähigkeit zur mitotischen Zellteilung und schließlich der Tod auf. Nur Krebszellen haben eine unbegrenzte Teilungskapazität.

(2) Bei niederen Tieren ist Alterung verbunden mit einer Abnahme der mitotischen Zellteilungsrate (z.B. Amöben: Danielli u. Muggleton 1959; Ciliaten: Sonneborn 1954), mit einer generellen Abnahme der Stoffwechselintensität und -effektivität aller Zellen (bei Organismen, deren Körperzellen sich in adultem Zustand nicht mehr mitotisch teilen, z.B. Nematoden : Kisiel et al. 1975), oder mit einer Schwächung lebenswichtiger Organe, wie Gehirn und Herzmuskel (z.B. Insekten: Levenbook u. Krishna 1971).

(3) Bei höheren Pflanzen kann Seneszenz die gesamte Pflanze betreffen, oder auch nur einzelne Organe wie Früchte, Blätter oder bestimmte Sproßteile; sie wird beeinflusst durch Pflanzenhormone , z.B. Cytokinine bzw. Abscisinsäure (Platt 1976).

(4) Seneszenz bei Hyphenpilzen, auf die im folgenden näher eingegangen werden soll, ist durch folgende Symptome charakterisiert : Abnahme der Wachsrates des Myzels (d.h. verringerte mitotische Teilungsrate), morphologische Veränderungen der Hyphen, schließlich Wuchsstop und Tod (Esser u.Kuenen 1967).

Bei vielen dieser Objekte sind intensive physiologische und teilweise auch genetische Untersuchungen durchgeführt worden (zusammenfassende Darstellungen z.B. bei Curtis 1966, Comfort 1974, Platt 1976).Eine allgemein akzeptierte Deutung all dieser Phänomene existiert aber bisher nicht. Es gibt eine Vielzahl von Theorien über mögliche Ursachen der Seneszenz, die von Ergebnissen bei einzelnen Objekten ausgehen, deren allgemeine Bedeutung jedoch umstritten ist (Hayflick 1975).Grundsätzlich werden zwei kontroverse Auffassungen vertreten:

(1) Altern wird verstanden als "Unfall", der durch spontan und zufällig auftretende Fehler in verschiedenen Stoffwechselbereichen bzw. Strukturen wie z.B. DNA, Translation, Membranen, etc. verursacht wird (z.B. Orgel 1963; Curtis 1971). Der bei vielen Objekten nachgewiesene Einfluß der genetischen Information auf die Lebensdauer wird u.a. mit einer genetisch fixierten Anfälligkeit für Fehler erklärt (Holliday 1977).

(2) Eine zweite Gruppe von Gerontologen sieht im Alterungsvorgang einen Differenzierungsschritt, der nach einem genetisch fixierten Programm abläuft (Hayflick 1973; Strehler et al. 1971; Bullough 1971; s.a. Hill u. Franks 1977).

Es gibt eine Vielzahl experimenteller Ansätze zur Überprüfung dieser Alternative, aber bisher noch keine befriedigende Antwort.

Ein großes Problem bei Untersuchungen dieser Art ist die Komplexität vieler Untersuchungsobjekte. Hervorragend geeignet aufgrund ihrer Einfachheit sind vor allem zwei Systeme: Zellkulturen und Hyphenpilze, die sich in einigen Bereichen sehr ähnlich sind: es handelt sich um undifferenzierte Zellen, die genetische Homogenität aufweisen, sog. "Klone" (wobei allerdings bei Pilzen aufgrund der cytoplasmatischen Kontinuität keine echten "Zellen" vorliegen); der Eintritt der Seneszenz ist leicht meßbar anhand der Abnahme der Teilungskapazität bzw. der Wachsrates (Hayflick 1965).

Pilze haben dabei den Vorteil einer leichten experimentellen Handhabung und sind wesentlich besser für genetische Untersuchungen geeignet (Esser u. Kuenen 1967). Es liegt eine Reihe von Arbeiten zur Seneszenz bei Pilzen vor, auf die in

einer Übersicht noch eingegangen wird (s. Tabelle 1). Zunächst aber soll im folgenden das Seneszenzsyndrom bei Podospora anserina exemplarisch vorgestellt werden, weil es das bisher best- untersuchte System in diesem Bereich darstellt, und weil es Gegenstand der experimentellen Untersuchungen dieser Arbeit ist.

B. Seneszenz bei Podospora anserina

1. Beschreibung:

Podospora anserina ist ein Ascomycet aus der Familie der Sordariaceae; sein Entwicklungszyklus ähnelt dem von Neurospora crassa, allerdings werden keine keimungsfähigen Konidien ausgebildet, sondern nur als männliche Fortpflanzungszellen dienende Mikrokonidien, sog. "Spermastien" (Einzelheiten bei Esser 1974). Podospora ist besonders gut für genetische Untersuchungen geeignet, aufgrund der Größe seiner Ascosporen und des besonderen Kernverteilungsmechanismus bei der Ascosporenbildung (Esser u. Kuenen 1967; Esser 1974).

Ein Ascus enthält im Normalfall vier zweikernige Ascosporen, die stets heterokaryotisch für postreduzierte Marken sind. Da der Kreuzungstyp hochgradig postreduziert ist (98 %, feststellbar aufgrund der fast vollständigen positiven Chromosomen - Interferenz), sind praktisch alle Myzelien aus solchen Sporen selbstfertil. Bei 1 - 2 % der Asci treten allerdings mehr als vier Sporen auf (Dowding 1931), wobei normalerweise je 2 kleinere, einkernige Sporen eine "große" ersetzen. Diese "kleinen" Sporen keimen zu selbstinkompatiblen homokaryotischen Myzelien aus.

Ein besonderer Vorteil ist die Möglichkeit, relativ einfach cytoplasmatische Vererbung nachzuweisen: die Spermastien ent-

halten praktisch nur Kernmaterial, so daß das Cytoplasma der Nachkommen ausschließlich auf die Mutter zurückgeht.

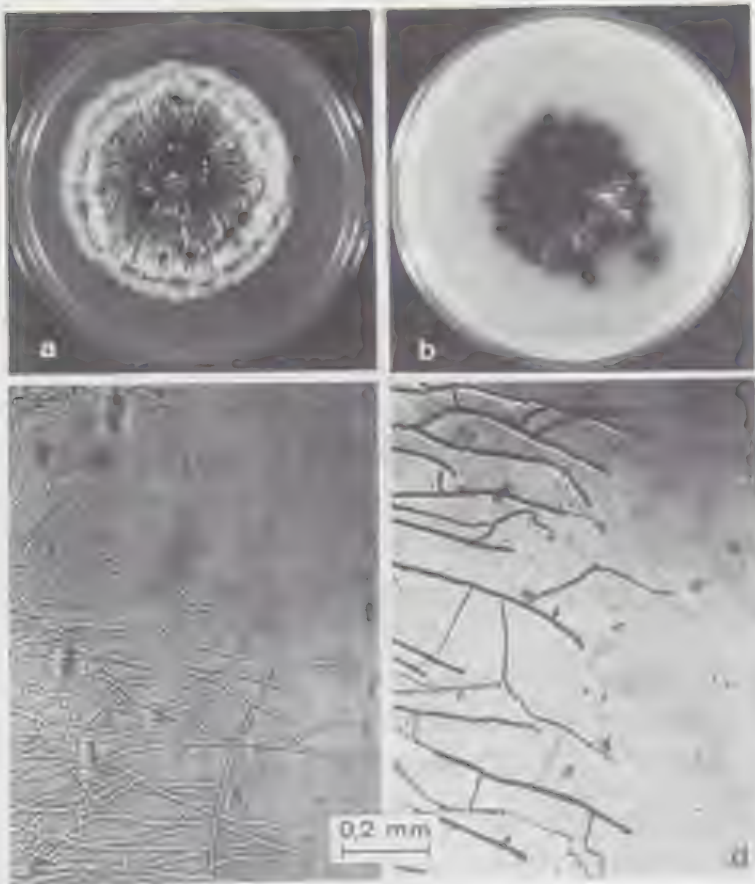


Abbildung 1 : Juveniles und senescentes Myzel von Podosporea anserina : (a) juvenile Kolonie, (b) seneszente Kolonie, (c) juvenile Hyphen, (d) seneszente Hyphen

Alle bisher untersuchten Wildstämme von Iodospora anserina zeigen nach längerer vegetativer Vermehrung Seneszenzsymptome (Abb. 1): die Wuchsrate nimmt ab, die peripheren Hyphen verformen sich und zeigen ein abnormes Verzweigungsmuster, die Hyphenspitzen schwellen an und können platzen. Schließlich kommt es zum völligen Wuchsstop und zum Absterben der Hyphen. Wird der Pilz auf Langwuchsröhrchen (s.u.) angezogen, so treten diese Symptome reproduzierbar nach einer bestimmten Wuchsstrecke auf.

Dieses Syndrom wurde von Rizet (1953 a) zuerst beschrieben und in der Folgezeit zusammen mit Marcou intensiv untersucht (Marcou 1954 a,b; 1957; 1958; 1961; Marcou u. Schecroun 1959; Rizet 1953 b; 1957; Rizet u. Marcou 1954).

2. Untersuchungen von Rizet und Marcou:

Die Ergebnisse dieser umfangreichen Untersuchungen lassen sich wie folgt zusammenfassen:

- a) Der Zeitpunkt des Eintretens der Seneszenzsymptome, der sog. Seneszenzpunkt, ist abhängig von Umwelteinflüssen bzw. Kulturbedingungen: Dauerlicht, hohe Temperaturen und reiches Nährstoffangebot verkürzen die Lebensdauer, ebenso häufiges Überimpfen und Verwendung sehr kleiner Impfstücke. Bei 30°C lassen sich Myzelien jahrelang aufbewahren, ohne daß Alterungserscheinungen auftreten.
- b) Die durchschnittliche Lebensdauer eines Stammes (bei konstanten Außenbedingungen) ist genetisch determiniert: bei den verschiedenen geographischen Rassen von Podospora anserina, die sich meist in mehreren Genen unterscheiden, treten die Seneszenzsymptome nach recht unterschiedlichen Wuchszeiten

auf, der durchschnittliche Seneszenzpunkt ist innerhalb einer Rasse aber konstant (Rasse E z.B. 106 d, Rasse A 10 d). Aber auch einzelne Gene können Einfluß auf die Lebensdauer haben, z.B. der Kreuzungstyp- und der incoloris - Lokus.

Bei einigen Rassen wachsen Stämme mit dem Kreuzungstyp + deutlich länger als ansonsten isogene Stämme des Kreuzungstyps -; Stämme, die eine Mutation im incoloris -Lokus tragen (gestörte Pigmentbildung, weibliche Sterilität) wachsen erheblich länger als der Wildstamm.

c) Seneszenz wird mütterlich vererbt: dies konnte nachgewiesen werden, weil die Fähigkeit zur sexuellen Fortpflanzung auch in seneszenten Myzel erhalten bleibt. Überschwemmt man ein homokaryotisches seneszenten Myzel mit Spermastien eines juvenilen Stammes des anderen Kreuzungstyps (Abb. 2), so treten in den Perithezien "seneszente" Sporen auf, d.h. solche, bei denen das Myzel kurz nach dem Auskeimen abstirbt. Allerdings sind nicht alle Nachkommen einer solchen Kreuzung seneszent : je nach Rasse sind 10 - 80 % der gebildeten Sporen völlig normal; dabei sind stets alle vier Sporen eines Ascus und alle Asci eines Peritheziiums einheitlich, es gibt also nur rein "juvenile" und rein "seneszente" Perithezien.

Marcou berichtet allerdings in einem Fall auch vom Vorkommen gemischter Perithezien und Asci; dieses Phänomen trat aber nur in einer einzigen Kreuzung auf und wurde nie wieder beobachtet.

Bei der reziproken Kreuzung (juveniler Stamm als "Mutter") sind alle Nachkommen juvenil (Abb. 2).

Es muß also ein Seneszenz - auslösendes Prinzip ("determinant d'senescence") geben, das im Cytoplasma lokalisiert ist und bei der Meiose an die Nachkommen weitergegeben werden kann.

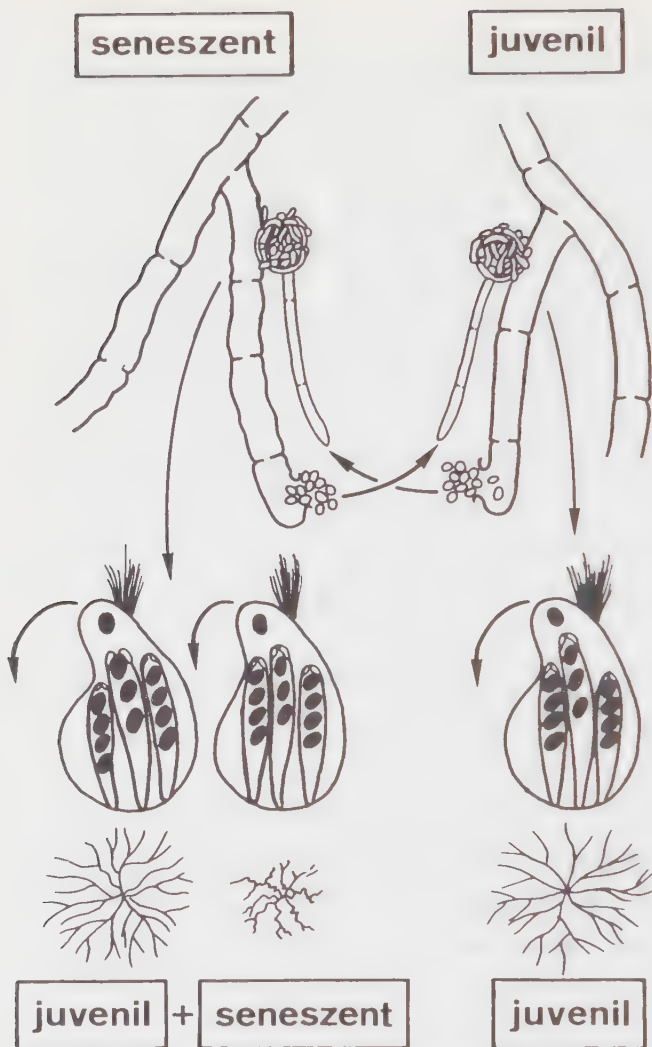


Abbildung 2 : Schematische Darstellung der "mütterlichen" Vererbung der Seneszenz bei *Fodospora anserina*. Bei der reziproken Kreuzung seneszent x juvenil sind alle Nachkommen der juvenilen "Mutter" juvenil, bei der seneszenten "Mutter" treten Perithezien mit juvenilen und solche mit seneszenten Sporen auf. Einzelheiten im Text.

Entweder ist dieses Prinzip diskontinuierlich im Cytoplasma des seneszenten Myzels verteilt, so daß es nur in einem Teil der gebildeten Ascogone auftritt, oder es kann während der Meiose eliminiert werden (s.u.).

d) Seneszenz ist infektiös: sie läßt sich durch Anastomosen von seneszenten auf juvenile Hyphen übertragen, unter Bedingungen, bei denen Kernwanderung ausgeschlossen werden kann. Marcou konnte nachweisen, daß in den betroffenen juvenilen Hyphen ein "Infektionsgefälle" auftritt: isolierte Fragmente einer solchen Hyphe zeigen mit zunehmender Nähe zur Anastomose eine immer stärker reduzierte Lebensdauer. Das infektiöse Prinzip wandert also offensichtlich durch die Anastomose in die junge Hyphe ein und induziert dort Seneszenzsymptome.

e) Das infektiöse Prinzip ist schon einige Zeit (bei Rasse S etwa 10 Tage) vor Auftreten der Seneszenzsymptome in den Hyphen vorhanden. Marcou unterscheidet deshalb innerhalb der morphologisch juvenilen Phase zwei physiologische Phasen, wobei in der ersten das infektiöse Prinzip nicht vorhanden ist (zumindest nicht in aktiver Form); die zweite Phase wird durch das erste Auftreten des Prinzips eingeleitet und ist als Inkubationsphase aufzufassen, in der sich das Prinzip bis zur lethalen Konzentration vermehrt.

Nach Marcous Ansicht ist das Auftreten des Prinzips ein zufälliges Ereignis, d.h. die erste physiologische Phase hätte keine bestimmte Dauer. Sie leitet dies aus den von ihr beobachteten großen Schwankungen in Bezug auf den Seneszenzpunkt von Parallelkulturen ab; dies ist auch der Grund für die hohe Zahl von Parallelansätzen, die sie jeweils durchführt. Bei der Anzucht auf Langwuchsröhrchen aber - im Gegensatz zu der von Marcou angewandten Überimpfung im 48 h-Rhythmus auf Schrägagar-Röhrchen - beträgt die Schwankung

des Seneszenzpunkts beim Wildstamm nur wenige Tage (s. Tabelle 8 : Kontrolle).

f) Seneszenz läßt sich unter bestimmten Bedingungen partiell heilen: hält man senescente bzw. fast-senescente Myzelien für einige Zeit unter Bedingungen, die zu einer starken Reduktion des Stoffwechsels führen (Austrocknen, Aufbewahren im Kühlschrank, unter Stickstoff, unter Öl, etc.), so wachsen diese Myzelien anschließend unter Normalbedingungen wesentlich weiter, als es ihrer normalen Lebenserwartung entsprechen würde. Wiederholt man diese Behandlung bei demselben Myzel mehrere Male, so läßt sich eine ganz erhebliche Lebensverlängerung erzielen.

Die einfachste Erklärung für dieses Phänomen (und auch für die oben erwähnte Juvenilisierung durch sexuelle Fortpflanzung) wäre die Annahme einer diskontinuierlichen Verteilung des infektiösen Prinzips in seneszenten Hyphen. Bei starker Reduktion des Stoffwechsels könnten die nicht infizierten Bereiche einen selektiven Vorteil haben und weiterwachsen. Da diese Behandlungsmethoden aber gleichermaßen auch bei Myzelien aus "seneszenten" Ascosporen wirken, bei denen eine gleichmäßige Infektion aller Hyphenbereiche angenommen werden muß, kann die Beteiligung spontaner "Heilungen", d.h. eine Zerstörung oder Inaktivierung des Prinzips in einigen Myzelbereichen, nicht ausgeschlossen werden.

Bei aller Detailliertheit dieser Untersuchungen blieb die Natur des infektiösen Prinzips bzw. generell die physiologischen Grundlagen des Seneszenzsyndroms bei Dodospora anserina ungeklärt.

Marcou diskutiert die mögliche Beteiligung von Viren oder Episomen; sie läßt auch die Beteiligung eines "epigenetischen"

Phänomens für möglich, im Sinne der von Delbrück (1949) diskutierten verschiedenen stabilen Zustände der Regulationssysteme einer Zelle.

Trotz der vielen auch von Marcou angegebenen Ansatzpunkte zu einer möglichen Aufklärung dieser Fragen ist bisher nur eine sehr begrenzte Anzahl von Folgearbeiten erschienen; diese brachten darüberhinaus praktisch keine Fortschritte im Hinblick auf die Lösung der grundlegenden Probleme.

3. Neuere Untersuchungen:

Holliday (1969) ließ Fodospora - Stämme auf verschiedenen Aminosäure - Analoga wachsen, um eine erhöhte Fehlerquote in der Proteinsynthese zu induzieren. Bei einigen Versuchsansätzen starben die behandelten Stämme signifikant eher ab, erholten sich aber teilweise wieder, ähnlich wie die "stopper" Mutanten (s.u.) von Neurospora crassa. Holliday sieht in diesen Ergebnissen eine Bestätigung für die Fehlerkatastrophen-Theorie von Orgel (1963), obwohl er selbst zugibt, daß die Ergebnisse nicht ganz eindeutig sind.

Orgel geht davon aus, daß in jeder Zelle eine konstante Fehlerquote der Proteinsynthese existiert. Die entstehenden fehlerhaften Proteine werden normalerweise eliminiert; wenn aber ein Protein betroffen ist, das unmittelbar an der Proteinsynthese selbst beteiligt ist (z.B. eine Amino-Acyl-t-RNA-Synthetase), so kann sich dieser Fehler vervielfachen. Orgel postuliert in diesem Fall einen exponentiellen Fehleranstieg, der schließlich zu einer Fehlerkatastrophe, d.h. dem Zusammenbruch des Stoffwechsels führt. Nach Hollidays Auffassung könnte ein fehlerbehaftetes Proteinsynthesystem durchaus infektiös sein.

Der recht weitreichenden Interpretation von Holliday steht

entgegen, daß die Experimente in dieser Form keine positive Beweisführung erlauben, da nicht sichergestellt ist, daß wirklich in den natürlichen Seneszenzvorgang eingegriffen wurde. Es ist garnicht unwahrscheinlich, daß man mit recht unspezifischen Mitteln ein komplexes biologisches System aus dem Gleichgewicht bringen kann.

Die Untersuchungen von Smith und Rubenstein (1973 a und b) sind wesentlich detaillierter und erbrachten eine Reihe interessanter Ergebnisse:

a) Die von Marcou bei der Rasse S von Podospora anserina gefundenen Gesetzmäßigkeiten bei der Entwicklung der Seneszenz konnten bei der kurzlebigen Rasse A bestätigt werden.

b) Eine mathematische Auswertung der Wuchsanalysen von Fragmenten aus verschiedenen alten Myzelien erbrachte Hinweise auf einen partikulären Charakter des infektiösen Prinzips.

Eine Abschätzung mit Hilfe der Poisson - Verteilung führte zu einem Wert von 1 - 5 Partikeln pro Segment in seneszentem Myzel.

c) Durch kurzzeitige Behandlung mit stark wuchshemmenden Konzentrationen von Cycloheximid und Cyanid kann eine vorübergehende "Juvenilisierung" von seneszentem Myzel erreicht werden. Dies gelingt nicht mit verschiedenen Inhibitoren der mitochondrialen Funktionen.

Diese Ergebnisse sind als Parallele zu den Juvenilisierungsversuchen von Marcou aufzufassen, da auch hier eine vorübergehende drastische Reduktion des Stoffwechsels beteiligt ist.

d) Es konnte gezeigt werden, daß auch die Lebensdauer einer Rasse cytoplasmatisch determiniert ist: bei Interrassenkreuzungen tritt in der Nachkommenschaft immer die Lebensdauer der

"Mutter" auf. Bei den Rassen A und S konnte dies an reziproken Kreuzungen nachgewiesen werden, darüberhinaus auch bei anderen Kombinationen, bei denen allerdings aufgrund von Inkompatibilitätserscheinungen (Esser 1956; 1959) nur jeweils eine Kreuzung fertil ist.

Diese Ergebnisse konnten von Marcou und Raynal (1978) bestätigt werden: sie fanden, daß die Lebensdauer auch durch Anastomosen zwischen verschiedenen Rassen übertragen werden kann, wobei die jeweils kürzere Lebensdauer "dominant" ist. Es muß also ein infektiöses "Lebensdauer - Partikel" existieren; ob es sich dabei um eine Vorstufe des Seneszenzfaktors handelt, ist noch völlig offen.

Esser und Keller (1976) fanden, daß der Einfluß des Genoms auf die Ausprägung der Seneszenz noch weitaus größer ist, als Marcou angenommen hatte. Sie beschreiben ein weiteres Gen, vivax, das etwas lebenverlängernde Wirkung hat; in Verbindung mit einer Mutation im eng-gekoppelten incoloris -Lokus aber tritt eine synergistische Wirkung auf: die entsprechenden Doppelmutantenstämme sind praktisch unsterblich (s. Tabelle 5).

Untersuchungen von Fozarth (1978) und Lemke (pers.Mitteilung) ergaben keinerlei Hinweise auf eine Beteiligung von Pilzviralen bzw. doppelsträngiger RNS in diesem System.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß die Untersuchungen zum Seneszenzsyndrom bei Fodospora anserina zu einer recht guten Beschreibung des Systems geführt haben, daß aber die Ursache, d.h. die Natur des infektiösen Prinzips, seine Entstehung, Entwicklung und Ausprägung, bisher nicht aufgeklärt werden konnte.

C. Seneszenzerscheinungen bei anderen Pilzen

Nach der ersten Beschreibung der Seneszenz bei Podospora anserina durch Rizet (1953 a) wurden bei einer Reihe von anderen Pilzen ähnliche Symptome entdeckt und auch in einigen Fällen näher untersucht. In Tabelle 1 wird versucht, einen Überblick über die bisher bei Pilzen beschriebenen Seneszenzerscheinungen zu geben; dabei soll kein Anspruch auf Vollständigkeit erhoben werden.

Bei einigen Pilzen treten - ähnlich wie bei Podospora anserina - nach längerer vegetativer Vermehrung regelmäßig und spontan Seneszenzsymptome auf, z.B. bei Podospora versatilis, Aspergillus glaucus, Ascobolus stercorarius, Pestalotia annulata und Helminthosporium victoriae (Literatur s. Tab.1); bei all diesen Organismen äußert sich Seneszenz durch Absterben der Wachsfrent, sie wird cytoplasmatisch determiniert und ist durch Infektion übertragbar.

Das best - untersuchte Objekt dieser Gruppe ist der "vegetative death" von Aspergillus glaucus (Linka 1954; 1959) : bei längerer vegetativer Vermehrung dieses Pilzes tritt regelmäßig irgendwann ein Wuchsstop mit typischen Seneszenzsymptomen auf; allerdings ist der Zeitpunkt sehr unbestimmt: die Lebensdauer von isogenen Parallelkulturen kann 5 Monate bis zwei Jahre umfassen. Dieser "vegetative Tod" ist infektiös, d.h. er wandert in junge Hyphen ein; in Heterokaryen zwischen juvenilen und seneszenten Partnern ist das seneszente Plasma suppressiv. Im Unterschied zu Podospora anserina geht bei diesem Organismus die Fähigkeit zur sexuellen Fortpflanzung in den infizierten Myzelien verloren; eine eingehende gene-

a) Spontan auftretende Seneszenzsymptome

<u>Podospora anserina</u> :		
<u>Podospora setosa</u> :		
<u>Aspergillus glaucus</u> :	Wachstestop, Absterben der Hyphenspitzen, cytoplasmatisch determiniert, übertragbar durch Infektion	Rizet 1953 a Rizet 1953 b Jinks 1959 Caten 1972 Marcou 1961 Chevaugne u. Digbeu 1960 Lindberg 1959 Sheng 1951 Bertrand et al. 1963 Poulter 1969
<u>Aspergillus anstelodami</u> :		
<u>Ascobolus stercorarius</u> :		
<u>Pestalotzia annulata</u> :		
<u>Helminthosporium victoriae</u> :		
<u>Neurospora crassa</u> - Mutante "ad":		
- Mutante "stopper":	reversibles Absterben der Wuchsfrost	
<u>Physarum polycephalum</u> :	Absterben des Plasmodiums, genetisch determiniert	

b) Induzierte Seneszenzsymptome

<u>Neurospora crassa</u> - Wildstamm:	Aminosäureanaloga, 33°C	Munkres 1976 b
- Leucin-Mutante:	Minimalmedium, 37°C	Printz u. Gros 1967
- Temp. sensit. Mutante:		Inoue u. Ishikawa 1975
- Inositol-Mutante:		Sullivan u. Debush. 1973
<u>Kloeckera apiculata</u> - Inos.-Müt.:	Wachstestop nach kurzer linearer Wachstumsphase, Zelltod	Ridgeway u. Dougl. 1958
<u>Sacch. carlsbergensis</u> - Inos.-Müt.:		Kuraishi et al. 1971
<u>Sacch. cerevisiae</u> - Eiotin - Müt.:		Henry 1973
- Petteäure-Synthet.-Müt.:		Shimada et al. 1977
- Pantothenat - Müt.:		Pontecorvo et al. 1955
<u>Aspergillus nidulans</u> - Eiotin -Müt.:		
c) Sonstiges		
<u>Sclerotium bataticola</u> :	Wachstestop in Flüssigmedium, keine echten Seneszenzsymptome, "Alterung" im zentralen Bereich	Cottlieb u. VanEtten 1966
<u>Rhizoctonia solani</u> :	Degeneration von Sporangien	Memmes u. Hohl 1975
<u>Phytophthora palmivora</u> :		

Tabelle 1: Zusammenstellung der bei Pilzen beschriebenen Seneszenz-Erscheinungen. Nähere Beschreibung der Seneszenzsymptome im Text

tische Analyse war daher bisher nicht möglich.

Ein ähnliches System wurde von Caten (1972) bei Aspergillus amstelodami (einem Mitglied der A.glaucus - Gruppe) nachgewiesen. Dieses wurde zunächst auch "vegetative death" genannt, dann aber in "ragged" umbenannt, weil Symptome und Entstehungsmodus zwar ähnlich sind, aber "ragged" z.B. nicht völlig abstirbt. Physiologische Untersuchungen erbrachten Hinweise für das Vorliegen einer mitochondrialen Mutation; so tritt bei dieser Mutante ein verändertes Cytochromspektrum auf (Hendley und Caten 1975).

Aber auch bei einem normalerweise unbegrenzt vegetativ zu vermehrenden Pilz, wie z.B. Neurospora crassa, gibt es eine Reihe von Möglichkeiten, Seneszenzsymptome zu untersuchen:

- bei Anzucht des Wildstammes von N.crassa auf 5-Fluor-Tryptophan-haltigem Medium tritt nach einigen Tagen linearen Wachstums (mit etwas geringerer Wachsrates als normal) eine exponentielle Abnahme der Wachsrates auf; bei 33°C kommt es sogar zu einem irreversiblen Absterben der Wachsratesfront (Munkres 1976 b);
- homokaryotische Myzelien der Mutante "natural death" (nd) von N.crassa (Sheng 1951) wachsen nach dem Auskeimen der Spore nur wenige Tage linear, dann treten spontan und irreversibel Seneszenzsymptome auf;
- bei einigen anderen Mutanten von N.crassa (und auch verschiedenen anderen Pilzen, s.Tab.1) lassen sich durch bestimmte Kulturbedingungen Seneszenzsymptome induzieren, z.B. durch hohe Temperaturen, Mangelmedien, etc.. Da bei einigen dieser Mutanten die primären physiologischen Defekte bekannt sind,

wurden diese Systeme von einigen Arbeitsgruppen als Einstieg in eine physiologische Analyse der Alterungserscheinungen bei Pilzen benutzt und intensiv untersucht.

So wird die Mutante leu-5 von N.crassa , die einen Defekt in der Proteinsynthese aufweist und bei höherer Temperatur Seneszenzsymptome zeigt, als Bestätigung der Fehlerhypothese von Orgel (s.o.) herangezogen (Lewis u.Holliday 1970); die Tatsache, daß Inositol-bedürftige Mutanten von N.crassa und anderen Pilzen auf Inositol-freiem Medium Seneszenzsymptome aufweisen, die offensichtlich auf Membranschädigungen **zurückzuführen** sind, wird als ein Beweis für eine **wesentliche** Rolle der Membranen bei der Entwicklung der Seneszenz allgemein betrachtet (Sullivan u.Debusk 1973; Henry 1973; Munkrees 1976 a).

Weitreichende Interpretationen solcher Phänomene sind aber mit Vorbehalt zu betrachten, da keineswegs sicher ist, daß die bei diesen Systemen gewonnenen Erkenntnisse über physiologische Ursachen des jeweiligen Wuchsstops für die Auslösung natürlicher Seneszenzsymptome von Bedeutung sind.

Sehr vielversprechend sind aber neuere Untersuchungen an Schleimpilzen: nach mehrmaliger Subkultur des Plasmodiums von Physarum polycephalum treten makroskopische Alterungs-symptome auf (Poulter 1969; McCullough et al.1973): die Wachsrates nimmt ab, die Kultur wird nekrotisch und stirbt schließlich ab. Die Lebensdauer ist vom Genotyp des Stammes abhängig und kann einige Wochen bis einige Monate betragen ; sie ist relativ unabhängig von Außenbedingungen wie Temperatur und Licht. Aufgrund der leichten experimentellen Handhabung wären diese Organismen hervorragend für physiologische und genetische Untersuchungen von Alterungsphänomenen geeignet.

Abschließend soll auf die sehr detaillierten Untersuchungen von Gottlieb und Mitarbeitern an Phizoctonia solani und Coleotium bataticola hingewiesen werden (Gottlieb et al. 1968; Molitoris et al. 1968; Obrig u. Gottlieb 1970; Gottlieb u. Raghun 1976; Gottlieb u. Sharma 1976); hierbei handelt es sich aber um ein völlig anders geartetes System, und es ist fraglich, ob man in diesem Zusammenhang überhaupt von "Seneszenz" sprechen kann: diese Pilze sind auf Festmedium langlebig (Kliejunas u. Ko 1975); bei Anzucht in Flüssigkultur bleibt die Wuchsf front allerdings nach Erreichen eines bestimmten Durchmessers stehen, ohne aber abzusterben. Bei den Untersuchungen wurde das periphere Myzel als jung, das zentrale als alt bezeichnet; zwischen beiden wurden Unterschiede in einer Reihe von physiologischen Parametern gefunden (DNS-Gehalt, verschiedene Enzymaktivitäten, etc.). Mit dem Podospora - System sind diese Phänomene aber nicht vergleichbar.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß es eine große Vielfalt von Seneszenzerscheinungen bei Pilzen gibt; nur wenige von ihnen eignen sich aber zu einer eingehenden genetischen und physiologischen Analyse. Abgesehen von den Schleimpilzen ist sicher Iodospora anserina das im Moment am besten geeignete Objekt für solche Studien, weil hier bereits umfangreiche Voruntersuchungen und eine Reihe von Anhaltspunkten für weitere Arbeiten vorliegen.

II. Problemstellung

Die vorliegende Arbeit soll einen Beitrag leisten zur Aufklärung der Ursachen des Seneszenzsyndroms bei Podospora anserina, d.h. es soll versucht werden, einige der grundlegenden Fragen zu klären, die die Arbeiten von Rizet und Marcou (s.o.) offengelassen haben. Eine Wiederaufnahme der Untersuchungen zu diesem Zeitpunkt war aus verschiedenen Gründen sinnvoll und auch erfolgsversprechend :

- es gibt heute eine Reihe von mikrobiologischen, physiologischen und biochemischen Techniken, die vor 20 Jahren nicht zur Verfügung standen, z.B. die Protoplastenherstellung, der Einsatz von hochspezifischen Inhibitoren zur Aufklärung physiologischer Vorgänge, und Standardverfahren zur Isolation bestimmter Zellorganellen bzw. Stoffgruppen;
- die Kenntnisse über physiologische Zusammenhänge allgemein, über extrachromosomale Erbträger wie Mitochondrien, Viren und Plasmide, und über nukleo-cytoplasmatische Wechselwirkungen sind in den letzten 20 Jahren wesentlich vertieft worden;
- die Arbeit von Esser und Keller (1976, s.o.) bot einen wesentlichen Anhaltspunkt zu einer intensiven genetischen Analyse des Seneszenzsyndroms.

Im ersten Teil der Untersuchungen soll die "unsterbliche" Doppelmutante incoloris vivax (s.o.) näher analysiert werden; außerdem soll geklärt werden, ob es sich dabei um eine spezifische Wirkung dieser beiden Gene handelt, oder ob auch andere Gene in die Entwicklung der Seneszenz so entscheidend

eingreifen können. Im folgenden Teil werden dann Versuche zur Physiologie der Seneszenz dargestellt, Untersuchungen zur Natur des infektiösen Prinzips und zur Rolle verschiedener Stoffwechselbereiche bei seiner Entstehung und Vermehrung. Abschließend sollen die Ergebnisse im Zusammenhang diskutiert werden, und es soll versucht werden, eine Modellvorstellung über den Ablauf des Seneszenzvorgangs bei Podospora anserina zu entwickeln.

III. Material und Methoden

Organismus: Bei den physiologischen Untersuchungen wurde der Wildstamm s₁ von Podospora anserina verwendet (Beschreibung bei Esser 1974), bei den genetischen Analysen zusätzlich die in Tabelle 2 charakterisierten morphologischen Mutanten.

Nährmedien: Die Anzucht der Myzelien erfolgte im Normalfall auf Biomalz-Mais-Medium (Esser 1974), mit folgenden Zusätzen:

- zur Sporenkeimung : 0,44 % Ammoniumazetat
- zur Regeneration von Protoplasten (s.u.): 0,7 M NaCl
- bei Inhibitortests: sterilfiltrierte Lösungen der verschiedenen Substanzen (Zugabe nach Autoklvieren des Mediums, in gerade noch flüssigem Zustand).

Bei den genetischen Analysen wurde in Einzelfällen Minimalmedium I (Esser 1974) verwendet, bei den Untersuchungen zur Katabolitrepression synthetisches Medium I (Prillinger u.Esser 1977) mit der jeweils angegebenen Kohlenstoffquelle (statt Fruktose).

Kulturbedingungen: Zur genetischen Analyse wurden die Myzelien auf Agarmedium in Petrischalen, bei Wuchstests in Langwuchsröhrchen (40 - 50 cm, Durchmesser 1 cm; s.Marcou 1961) angezogen, für biochemische Untersuchungen in Flüssigmedium in Fernbachkolben (250 ml Medium) oder in belüfteten 10 - l-Flaschen (6 l Medium). Alle Anzuchten erfolgten bei 26°C und Dauerlicht.

Wuchstests: Zur Ermittlung der Lebensdauer wurden die betreffenden Myzelien auf Langwuchsröhrchen (s.o.) oder Petrischalen angezogen. Die Längenzunahme wurde je nach Stamm und Medium alle 3 - 7 Tage kontrolliert. Der Seneszenzpunkt wurde

zeichnerisch aus der Wuchskurve als Schnittpunkt der Verlängerungen des linear aufsteigenden bzw. des waagerechten Kurventeils ermittelt.

Genetische Methoden: Die Verfahren zur Auswertung von Kreuzungen, Bestimmung von Postreduktionsfrequenzen und Gen - Lokalisation sind bei Esser (1956; 1959; 1974) und Esser und Kuenen (1967) beschrieben.

Mitochondrienisolation: (Zentrifugationsschritte modifiziert nach Küntzel et al. 1973).

Das Myzel wurde über Mull geerntet, gewaschen mit Puffer (0,5 M Saccharose, 0,001 M EDTA, 0,05 M Tris/HCl, pH 7,4) und zwischen Filterpapier getrocknet. Nach dem Aufschluß im Mörser unter flüssigem Stickstoff wurde mit achtfacher Menge Puffer aufgenommen und schnell auf 4°C gebracht. Das Homogenat wurde durch eine vierfache Mullage gefiltert und 20 min. bei 1100 g zentrifugiert (der Zeitbedarf bis zu diesem Schritt darf 15 - 20 min. nicht überschreiten). Der Überstand wurde 60 min. bei 16.000 g zentrifugiert, das Mitochondrienpellet mit Puffer aufgenommen und auf Dichtgradienten gebracht (0,001 M EDTA, 0,05 M Tris/HCl pH 7,4, Saccharose 60 %, 35 %, 20 %, in Stufen von je 8 ml; Rotor SW 25, 90 min. bei 63.000 g).

Die Mitochondrienbande (oberhalb der 60 %-Stufe) wurde durch seitliches Anstechen abgelassen; zur Kontrolle Bestimmung der Cytochrom-C-Oxidase - (E.C.1.11.1.5) und Fumarase (E.C. 5.3.1.1) - Aktivität: bei Anwesenheit von intakten Mitochondrien in der Präparation müssen beide Aktivitäten meßbar sein.

Nukleinsäurenisolation (s.Stahl et al. 1978)

Das geerntete Myzel wurde mit SSC (0,15 M NaCl, 0,015 M Na-Citrat, pH 7,2) gewaschen und zwischen Filterpapier getrock-

net; je Gramm Feuchtgewicht wurde 1 ml SSC + 0,01 M Na-Di-äthylthiocarbamat + 0,02 M Na-Thioglykolat + 1% SDS zugegeben. Nach dem Aufschluß unter flüssigem Stickstoff im Mörser wurde die Suspension rasch auf 4°C gebracht und Phenollösung zugegeben (1 ml/g Feuchtgew.; 200 g Phenol, 22 ml SSC, 2,8 ml m-Kresol, 200 mg 8-Hydroxy-Chinolin; pH 7,0). Nach einer Stunde Rühren (Eisbad) wurde 30 min. bei 17.000 g zentrifugiert; die wässrige Phase wurde abgezogen und die Nukleinsäuren mit doppeltem Volumen kaltem Äthanol (-20 °C) ausgefällt. Die Nukleinsäuren wurden abzentrifugiert (10 min, 17000 g), in SSC aufgenommen und über Nacht gegen SSC dialysiert.

Protoplastenherstellung: Etwa 5 g(Feuchtgew.) von sehr jungem Myzel wurden mehrmals mit Protoplastenpuffer gewaschen (0,5 M Saccharose in Tris-Maleat-NaOH-Puffer pH 7,0), darin aufgenommen, im Mixer kurz zerschlagen und mit lytischem Enzymextrakt aus Trichoderma viride (DeVries u.Wessels 1972) 12 Stunden inkubiert (20°C; Reziprokschüttler 200/min.; Endkonzentration etwa 4 mg Enzym/ml). Die Ausbeute betrug je nach Enzymcharge und Myzelqualität 10^7 - 10^8 Protoplasten pro Ansatz.

Zur Regeneration wurde die entsprechend verdünnte Protoplastensuspension auf Petrischalen mit NaCl-stabilisiertem Maismedium (s.o.) ausgestrichen (Regenerationsrate 1 - 3%).

Infektionsversuche: 1 - 2 ml der Protoplastensuspension wurden mit der gleichen Menge an DNA-Extrakt (in SSC, OD₂₆₀ 40-50) bzw. Mitochondrienpräparation (in 35 %-Saccharose, s.o.) versetzt; zur Erleichterung der Aufnahme wurde Polyäthylenglykol (MW 6000; Endkonzentration 2 bzw. 20 %) und CaCl₂ (Endkonzentration 10 bzw. 50 mM) zugegeben. Inkubiert wurde 3 - 4

Stunden bei Zimmertemperatur (Reziprokschüttler 100/min.). Die Protoplastensuspension wurde wie beschrieben zur Regeneration ausgestrichen; nach 48 h wurden die gekeimten Protoplasten einzeln isoliert und auf normale Mais-Petrischalen zur Seneszenzpunkt-Bestimmung überführt. Als Kontrollen dienten mit reinem SSC bzw. 38 %-iger Saccharoselösung versetzte Protoplastensuspensionen, die genau wie die Infektionsansätze behandelt wurden.

Anastomosen: Anastomosen wurden nach der von Marcou (1961) beschriebenen Methode hergestellt (hängender Tropfen Ölkammer), mit Hilfe eines Leitz - Mikromanipulators. Die benötigten Mikro-Glaswerkzeuge wurden mit einer Mikroschmiede (Peaudouin, Montrouge) nach der Technik von DeFonbrune (1949) angefertigt.

Statistische Methoden: Versuche zur Ermittlung von Seneszenzpunkten und Wuchsraten wurden mit mindestens je 5, im Normalfall 10 - 15 Parallelansätzen durchgeführt. Angegeben wird jeweils der arithmetische Mittelwert ($\bar{x} = \sum x_i / n$, wobei n =Anzahl der Meßwerte; x_i =Meßwerte mit $i=1,2,3,\dots,n$) und (unter Annahme einer Normalverteilung) die Standardabweichung des arithmetischen Mittelwerts ($s\bar{x} = \sqrt{\frac{\sum x_i^2 - (\sum x_i)^2/n}{n(n-1)}}$; nach Campbell 1967).

Bei der Berechnung von Gen-Zentromer-Abständen im genetischen Teil wird jeweils der 99%-Vertrauensbereich angegeben; dieser wurde über Approximation durch die Normalverteilung nach der Formel $\pm z \cdot \sqrt{\frac{p(1-p)}{n}}$ bestimmt (p =Postreduktionsfrequenz, n = Zahl der analysierten Asci, $z=2,58$ bei 99%-Vertrauensbereich); dies ist auch bei Vorliegen einer Binomialverteilung möglich, wenn $n \cdot p \cdot (1-p) > 9$ (Sachs 1969).

IV. Ergebnisse

A. Genetische Untersuchungen

1. Einführung:

Seneszenz bei Podospora anserina wird zwar cytoplasmatisch vererbt (Abb.2), die genetische Information des Zellkerns hat aber dennoch erheblichen Einfluß auf die Lebensdauer dieses Pilzes; dies konnte für den Kreuzungstyp-Lokus und für die Gene incoloris und vivax gezeigt werden (s.o.). Die Langlebigkeit der von Esser und Keller (1976) beschriebenen Doppelmutante incoloris vivax beweist, daß durch geeignete genetische Konstellationen die Entwicklung der Seneszenz nicht nur verzögert, sondern völlig aufgehalten werden kann. Im folgenden soll untersucht werden, ob es sich dabei um eine spezifische Wirkung der Gene incoloris und vivax handelt, oder ob es noch weitere Gene gibt, die einzeln oder in Kombinationen die Lebensdauer entscheidend erhöhen können.

Mutanten dieser Art könnten eine große Hilfe bei der Analyse des physiologischen Ablaufs der Seneszenz sein, ähnlich wie die zur Aufklärung von Biosyntheseketten unentbehrlich gewordenen Auxotrophiemutanten (s.z.B. Horowitz 1950).

Außerdem soll die lebenverlängernde Wirkung von i viv näher analysiert werden; dabei ist vor allem interessant zu klären, ob es möglich ist, Seneszenzsymptome durch Infektion in i viv-Myzelien zu induzieren, oder ob diese Stämme immun gegen das infektiöse Prinzip sind.

2. Erbfaktoren mit lebensverlängernder Wirkung

a) Charakterisierung der untersuchten Mutanten:

Sieben Mutanten der Kollektion Esser wurden zusätzlich zu den Stämmen incoloris und vivax in die Untersuchungen einbezogen. Aus Tabelle 2 wird ersichtlich, daß diese Mutanten in der Morphologie deutlich vom Wildstamm unterschieden sind; die meisten sind in ihrer Sexualpotenz und in ihrer Phenoloxidasenproduktion gestört (letzteres wurde als Selektionskriterium verwandt, s.Prillinger u.Esser 1977).

Die in der Tabelle 2 ebenfalls aufgeführte Mutante irregularis trat während der Durchführung dieser Arbeiten spontan in i viv - Myzelien auf und wurde ebenfalls näher untersucht. Sie wurde zum ersten Mal bei der Kreuzung von i viv - Stämmen , die bereits längere Zeit kontinuierlich in Langwuchsröhrchen gewachsen waren, mit dem Wildstamm entdeckt: in diesen Kreuzungen traten neben den normalen vier- und fünfsporigen Asci irreguläre Asci mit zwei kleinen, runden Sporen und zwei normalen, großen Sporen auf (Abb. 3 b).Die Analyse der normalen Asci aus diesen Kreuzungen zeigte, daß in ihnen diese Irregularität normal "mendelte", d.h. offensichtlich durch eine Mutation in einem Kerngen verursacht wurde. In den meisten Fällen trat dieser Defekt zusammen mit dem incoloris - Phänotyp auf, gelegentlich aber zusammen mit Wildmorphologie, d.h. die Mutante irregularis unterscheidet sich im Myzelhabitus nicht vom Wildstamm (Abb. 3 a). Eine eingehende Untersuchung der Ausprägung von irregularis führte zu folgenden Ergebnissen:

Mutante	Symbol	Koppl. Grp.	Postred.-frequenz (%)	Morphologie	Fertilität	physiol. Defekt	Literatur
wild	s ₁	-	-	grau - schwarz	-	-	Esser 1974
zonata	z	IIr	83	braun, rhythmisch	weibl. steril	-	Esser u. Minuth 1970
incoloris	i	IIIr	80	farblos	partiell weibl. steril	Laccase-Prod. gestört	Esser 1974; Prillinger u. Esser 1977
nivea	n	IIIr	67	weiß, Luftmyzel reduziert	männlich u. weibl. gestört	-	Prillinger u. Esser 1977
vivax	viv	IIIr	79 ²	schwarz; Luftmyzel rhythm.	weiblich steril	-	Esser u. Veller 1976
irregu-laris	ir	IIIr ³	84 ⁴	grau - schwarz	-	-	-
grisea	gr	IVr	35	grau - schwarz, Luftmyzel reduz.	partiell weibl. steril	Laccase-Prod. gestört	Prillinger u. Esser 1977
lanosa	la	VR	77	Myzel samtartig	-	-	Esser 1974
tarda	ta	VIr	1,7	langsamer Wuchs, rhythmisch	-	-	-
crispa	cr	VIIr	71	gekrüseltes Luftmyzel	-	Laccase-Prod. gestört	Prillinger u. Esser 1977
cana	ca	VIIIi	66	weiß, dichtes Luftmyzel	partiell weibl. steril	-	-

1: Laccase : monophenol, dihydroxyphenylalanine : oxygen oxidoreductase (E.C. 1.14.18.1).

2: eig. Untersuchungen ergaben niedrigeren Wert (s.Tab.4). 3: s.Tab. 3 . 4: s. Tab.4

Tabelle 2: Charakterisierung einiger morphologischer Mutanten von *Podospora anserina*.

(1) Alle vier Sporen eines irregulären Ascus sind offensichtlich einkernig (bzw. homokaryotisch). Dies läßt sich z.B.

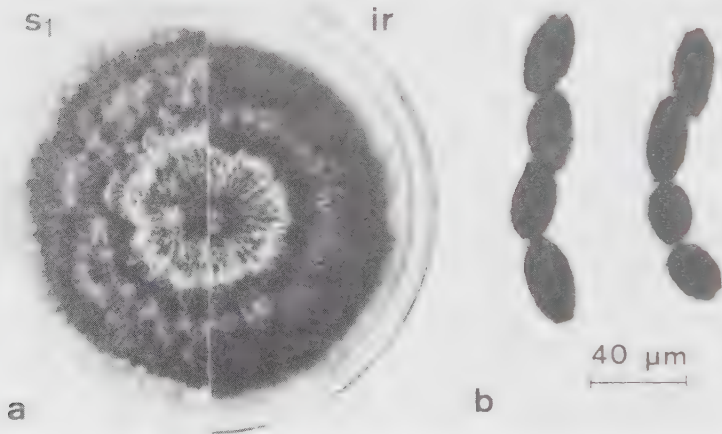


Abbildung 3 : Morphologische Charakterisierung der Mutante irregularis:

a) Myzelhabitus im Vergleich zum Wildstamm s_1
(Anzucht auf Maismedium Kulturalter 10 d)

b) Viersporige Asci aus der Kreuzung $ir \times ir^+$:
normal , mit vier großen Sporen (links), ir-
regulär, mit zwei kleinen und zwei großen Spo-
ren (rechts). Einzelheiten im Text.

an der Verteilung des Kreuzungstyps erkennen: wie bereits erwähnt ist in normalen viersporigen Asci von Podospora anserina jede Spore heterokaryotisch in bezug auf den Kreuzungstyp (Esser 1974). Die Sporen eines irregulären Ascus tragen aber jeweils nur einen Kreuzungstyp, wobei vier Verteilungstypen mit etwa gleicher Häufigkeit auftreten: große Sporen Kreuzungstyp +, kleine -; große Sporen -, kleine +; alle Sporen +; alle Sporen -. Das gleiche gilt für die Verteilung anderer Gene. Dies bedeutet, daß offensichtlich zwei der vier Meioseprodukte verlorengehen; da mindestens jeweils zwei Sporen identisch sind, muß die postmeiotische Mitose aber normal verlaufen.

(2) Der Anteil irregulärer Asci in einem Perithezium liegt immer bei ungefähr 30 %, d.h. die Unregelmäßigkeit tritt in etwa einem Drittel aller Meiosen auf.

(3) Perithezien aus der Kreuzung ir x ir enthalten keine irregulären Asci, ebenso nicht Selbstungsperithezien aus ir + ir - Heterokaryen. Nach Esser und Kuenen (1967) ist dies ein Hinweis auf das Vorliegen einer Chromosomenmutation, z.B. einer Deletion oder Translokation, weil sich bei der Paarung zweier homologer Chromosomen in der Meiose keine Unregelmäßigkeiten ergeben, wenn beide denselben Defekt tragen.

Um diese Interpretation abzusichern, und vor allem, um die Art einer eventuell vorliegenden Chromosomenmutation festzustellen, sind aber weitere genetische und cytologische Untersuchungen nötig, z.B. über den Verlauf der Kernteilung bei der Ascusbildung oder über eventuelle Chromosomen-Abnormalitäten, wie sie von Marcou (pers.Mitteil.) bei einigen anderen Mutanten von P.anserina cytologisch nachgewiesen werden konnten.

Kreuzung Gen 1 · Gen. 2	Koppl. Grp.	Anzahl Asci	Ascusverteilung hinsichtlich des Reduktions- modus beider Gene										Postreduktions- frequenz (%)	
			Reduktionsmodus										Gen 1	Gen 2
			Gen 1 post					post prae prae						
			Gen 2 post	prae	post	prae	post	prae	post	prae	post	prae		
			Tetra- dentyp											
			T	T	R	T	T	T	T	T	R			
			1	3	2	4	5	6	7					
ir ¹	viv	IIIr	63	41	3	12	1	5	1	89,9	71,4	eng gekoppelt ($p < 0,01$)		
	i	IIIr	63	55	-	4	1	3	-	93,6	89,9			
	n	IIIr	66	55	-	4	-	7	-	89,4	93,3			

1: Unterscheidung der Ascustypen 1 und 3 bzw. 2 und 3 nicht möglich

Tabelle 3: Lokalisation des Genes Irregularis durch Tetradanalyse. Einzelheiten bezüglich der Identifizierung der verschiedenen Ascustypen und der Berechnung von Postreduktionsfrequenzen bei Esser und Fuenen (1967). Kopplungskriterien sind signifikante Abweichungen der Parental- und Rekombinationsditypen vom Verhältnis 1:1 (Ascustypen 1 u.2 bzw. 6 u.7).

Die aufgrund der oben erwähnten Vorversuche vermutete Koppelung der Gene irregularis und incoloris konnte durch eine genetische Analyse bestätigt werden. Wie aus Tabelle 3 zu ersehen, überwiegen bei den Nachkommen aus Kreuzungen von ir mit n, viv und i jeweils eindeutig die Parentaltypen, d.h. ir ist mit diesen Genen gekoppelt, liegt also auf dem rechten Arm der Kopplungsgruppe III. Da bei diesen Kreuzungen eine Unterscheidung der Ascustypen 1 bzw. 2 und 3 nicht ohne weiteres möglich ist (nur mittels einer zeitaufwendigen genetischen Analyse der großen Sporen, s.Esser u.Kuenen 1967), läßt sich der Rekombinationswert nicht exakt angeben. Die relative Zuordnung dieser vier Gene (Abb.4) wurde deshalb aufgrund der Postreduktionswerte vorgenommen, die aus sämtlichen mit diesen Genen durchgeführten Kreuzungen ermittelt wurden. Wie aus Tabelle 4 zu ersehen, stimmen die für die Gene i und n erhaltenen Werte (75,0 bzw. 70,7) mit denen von Prillinger und Esser (77,1 bzw. 67,4) recht gut überein; die Diskrepanz der Werte für das Gen viv (68,7 gegenüber 77,5) ist vermutlich auf die geringe Anzahl der von Esser und Keller (1976) analysierten Asci zurückzuführen. Die relative Lage von n und viv ist aufgrund der stark überlappenden Vertrauensbereiche nicht eindeutig anzugeben. Irregularis besitzt aber die relativ höchste Postreduktionsfrequenz und ist deshalb am weitesten vom Centromer entfernt, so wie in Abbildung 4 dargestellt.

b) Lebensdauer von Einzel - und Doppelmutanten:

Die Einzelmutanten lassen sich hinsichtlich ihrer Lebensdauer in zwei Gruppen zusammenfassen (Tabelle 5):

Gen	Korpl.- Grp.	Anzahl Asci	Iostreduktions- wert (%)	Gen-Centromer-Abstand (mit 99' Vertr. Bereich)	Literaturwerte		
					Postreduktions- wert (%)	Anzahl Asci	Autor
ir	IIIr	189	83,6	41,3 $\pm$ 3,5	-	-	-
viv	IIIr	444	68,7	34,4 $\pm$ 2,3	77,5	39	Esser u. Keller 1976
n	IIIr	191	70,7	35,4 $\pm$ 4,3	67,4	800	Prillinger u. Esser 1977
i	IIIr	344	75,0	37,5 $\pm$ 3,0	80,0 77,9 77,1 79,3	$\left[\begin{array}{l} 163 \\ 367 \\ 266 \end{array} \right]$	Esser 1974 Prillinger u. Esser 1977

Tabelle 4 : Genetische Charakterisierung der Mutante irregularis. Zur Ermittlung der relativen Lage der Gene auf Kopplungsgruppe IIIrechts sind auch die im Rahmen dieser Arbeit erhaltenen Werte für die Gene excelsioris, vivax und nigra zusammen mit den entsprechenden Literaturwerten aufgeführt. Der Gen-Centromer-Abstand entspricht dem halben Postreduktionswert (Esser u. Kuenen 1967).

Kopplungsgruppe	II		III				IV	V	VI	VII	
	Genes	z	viv	n	i	ir	gr	la	ta	cr	ca
z		21 ^{±2}	—	—	—	—	—	—	—	38 ^{±5}	—
viv			66 ^{±8}	> 400	> 1400	> 490	> 510	> 150	—	> 225	> 570
n				29 ^{±1}	> 930	18 ^{±1}	—	—	—	> 850	37 ^{±3}
i					42 ^{±2}	> 790	—	—	—	147 ^{±8}	47 ^{±4}
ir						25 ^{±1}	26 ^{±1}	—	—	52 ^{±6}	31 ^{±3}
gr							39 ^{±1}	—	55 ^{±7}	301 ^{±42}	—
la								33 ^{±1}	—	67 ^{±6}	—
ta									66 ^{±3}	58 ^{±8}	—
cr										44 ^{±2}	438 ^{±59}
ca											39 ^{±3}

Tabelle 5: Wirkung von 10 morphologischen Genen auf die Lebensdauer von *Podospora anserina*.¹

Die Lebensdauer der Einzelmutanten (Diagonale) und Doppelmutanten ist in Tagen angegeben. Die dunkel unterlegten Kombinationen zeigen synergistisch lebensverlängernde Wirkung. Die durch das Symbol > gekennzeichneten Doppelmutanten wuchsen noch bei Fertigstellung dieser Arbeit; die mit einem Querstrich versehenen Kombinationen wurden nicht getestet (Beschreibung der Mutanten s. Tab. 2).

1: Die Herstellung einiger Doppelmutanten erfolgte unter Mitwirkung von Frl. I. Grubbert

(1) keine signifikant höhere Lebensdauer als der Wildstamm haben die Mutanten z, n, ir und la ;

(2) etwa zwei- bis dreifache Lebensdauer des Wildstamms haben viv, i, cr, ca, gr und ta.

Die Lebensdauer der verschiedenen Einzelmutanten liegt also im Bereich der von Marcou (1961) untersuchten Rassen von Podospora anserina (z.B. Rasse A: 10 d, Rasse E: 106 d).

Durch Kreuzung dieser Einzelmutantenstämme untereinander wurden einige Doppelmutantenstämme isoliert und deren Lebensdauer ermittelt. Bei diesen Doppelmutanten tritt in erstaunlich vielen Fällen (über 50 %) eine ganz erhebliche Lebensverlängerung auf, d.h. die Gene zeigen in vielen Kombinationen eine ähnliche synergistische Wirkung, wie sie zuerst bei i viv beobachtet wurde. Dabei ergibt sich im Einzelnen (Tab.5):

(1) Gene, die in Kombinationen mit anderen solch eine synergistische Wirkung zeigen, finden sich auf fast allen Kopplungsgruppen.

(2) Der "Wirkungsbereich" dieser Gene ist sehr unterschiedlich: während vivax in allen untersuchten Kombinationen lebensverlängernd wirkt, trifft dies bei den anderen Genen nur in einem Teil der Kombinationen zu. Irregularis z.B. wirkt praktisch nur mit den eng gekoppelten Genen incoloris und vivax synergistisch, bei den anderen Kombinationen eher lebensverkürzend.

(3) Kombinationen zwischen den auf Kopplungsgruppe IIIr liegenden Genen viv, n, i und ir zeigen bis auf eine Ausnahme (n ir) synergistisch-lebensverlängernde Wirkung.

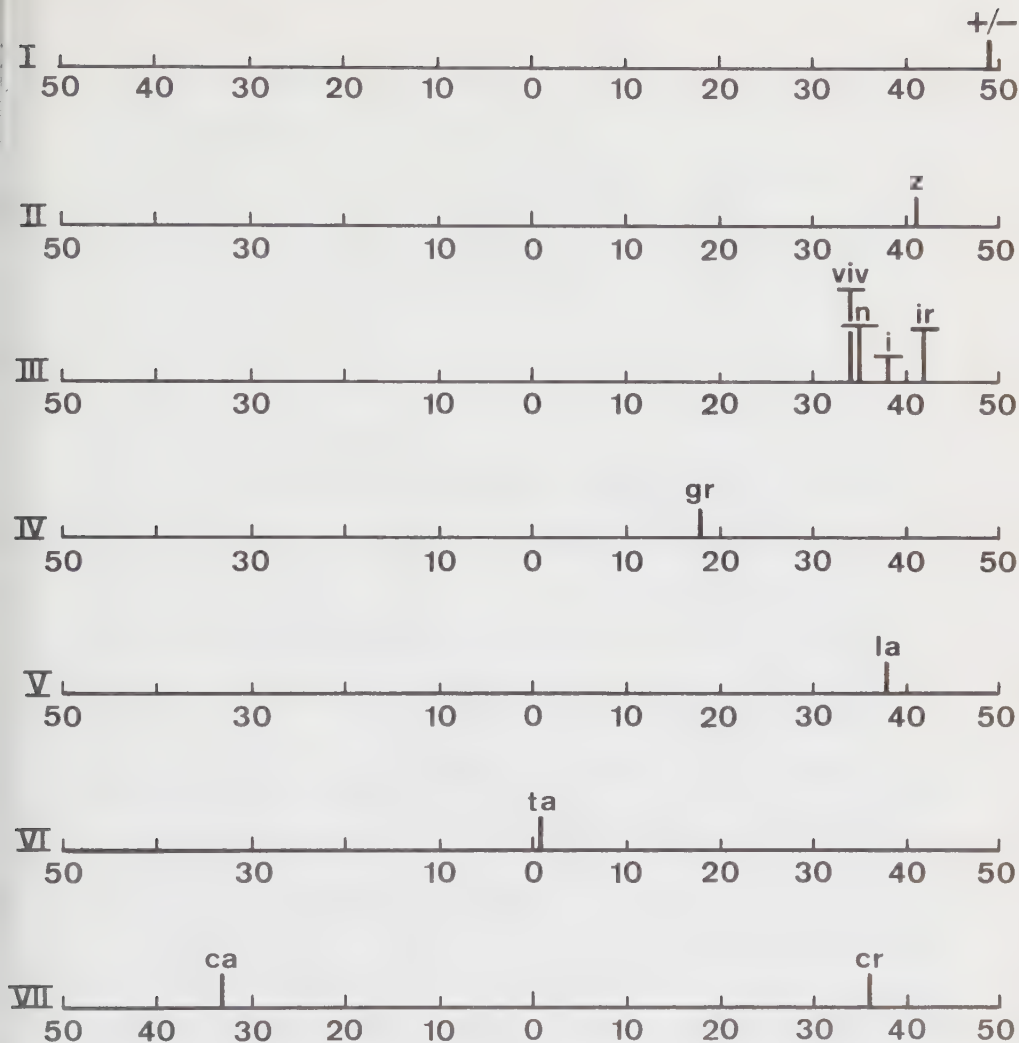


Abbildung 4 : Chromosomenkarte für die 7 Kopplungsgruppen von *Podospora anserina* (n.Esser u.Kuenen 1967). Eingezeichnet sind die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Mutanten. Bei den Genen der Kopplungsgruppe IIIr gibt die Balkenbreite den 99%-Vertrauensbereich des Gen-Centromer-Abstands an (s. Tabelle 4).

(4) Wie aus Tabelle 6 zu ersehen, gibt es - abgesehen von weiblicher Sterilität - kein gemeinsames morphologisches Merkmal, das eventuelle Rückschlüsse auf einen gemeinsamen Wirkungsmechanismus zuließe: fehlende Pigmentierung und verminderte Wachstumsrate bei der Doppelmutante i viv sind also keine unbedingte Vorbedingung für eine stark erhöhte Lebensdauer.

Zusammenfassend läßt sich also sagen, daß es offensichtlich eine ganze Reihe von Genen gibt, die Einfluß auf die Lebensdauer von Podospora anserina haben. Diese Gene finden sich auf fast allen Kopplungsgruppen; die Kopplungsgruppe III scheint hierbei aber besondere Bedeutung zu haben, da auf ihr vier dieser Gene eng gekoppelt lokalisiert sind.

3. Untersuchungen an der Doppelmutante i viv

a) Genetische "Probenahme" bei Langwuchs:

Untersuchungen an Neurospora crassa (Bertrand et al. 1968) haben gezeigt, daß bei ununterbrochenem Langwuchs von Myzelien über einen längeren Zeitraum mit dem Auftreten von spontanen Mutationen zu rechnen ist. Deshalb wurde bei den langlebigen Doppelmutantenstämmen regelmäßig nach Durchwachsen eines Langwuchsröhrchens eine Rückkreuzung gegen den Wildstamm durchgeführt, um festzustellen, ob die jeweilige Kernpopulation noch homogen war, d.h. ob ausschließlich die anfangs eingesetzten Doppelmutanten - Kerne vorhanden waren, oder ob zusätzliche Mutationen aufgetreten waren. Die Ergebnisse dieser Rückkreuzungen sollen am best-

Stamm	Morphologie	Fertilitätsdefekte	Wuchsrate (%)
wild (s ₁)	grau - schwarz, graue Luftthyphen	-	100
<u>viv n</u>	grau - schwarz, weiß gefleckt durch unregelmäßige Bildg.v.v. Luftthyphen		72
<u>viv i</u>	gelb bis rötlich, reduzierte Luftthyphen		80
<u>viv ir</u>	schwarz pigmentiert, Luftmyzel rhythm.	weibliche Fertilität stark vermindert	70
<u>viv gr</u>	schwarz - grün, Luftthyphen hell, wolzig		95
<u>viv ca</u>	grau - weiß, samtig - helles Luftmyzel		105
<u>i n</u>	weiß, dichte Luftthyphen		105
<u>n cr</u>	weiß, reduzierte Luftthyphen		125
<u>i ir</u>	farblos		70

Tabelle 6 : Morphologische Charakterisierung einiger langlebiger Doppelmutanten von Fodospora anserina. (Erklärung der Gen-Symbole und Charakterisierung der Einzelmutanten s. Tabelle 2. Anzuchtbedingungen s. Material u. Methoden)

untersuchten Beispiel, der Doppelmutante i viv, exemplarisch dargestellt werden.

Es wurden im Laufe der vorliegenden Arbeit neun Rückkreuzungen bei diesem Stamm durchgeführt. Dabei wurden folgende Beobachtungen gemacht:

- (1) In jeder Rückkreuzung war i viv nachweisbar;
- (2) es traten sehr viele zusätzliche morphologische Mutanten auf; da diese in den meisten Fällen genetisch nicht exakt analysiert wurden (d.h. nicht festgestellt wurde, ob es sich wirklich um Einzelmutanten handelte bzw. wo sie lokalisiert waren), kann ihre genaue Zahl nicht angegeben werden. In Tabelle 7 sind einige typische Beispiele aufgeführt, an denen die Mannigfaltigkeit der auftretenden Morphologien deutlich wird.
- (3) Das Spektrum der Mutanten wechselte ständig, wobei morphologisch identische Mutanten in maximal zwei bis drei Rückkreuzungen hintereinander auftraten (s.Tab.7). Eine Ausnahme in dieser Beziehung ist die Mutante irregularis (s.o.), die bei der ersten im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Rückkreuzung in allen Parallelansätzen entdeckt wurde, obwohl sie in den vorhergehenden Kontrollen nicht beobachtet worden war (Keller, pers. Mitteilung). Sie trat in der Folge bei allen anderen Rückkreuzungen auf, was wahrscheinlich auf ihre enge Kopplung mit i und viv zurückzuführen ist (s.o.). Es zeigt sich also, daß bei längerem kontinuierlichem Wuchs von langlebigen Stämmen eine Vielzahl von spontanen Mutationen auftritt; diese setzen sich aber in den meisten Fällen

Mutante	Morphologie auf		Asco-	Rückkr.	erstes Auftreten bei	Auftreten in
	Maismedium	Minimalmedium	sporen	Nr.	Wuchsstr. (cm)	folg. Rückkr. (Nr.)
8/1	normal	normal	irregulär ¹	1	274	438
9/1	normal	normal	gehäuft 7- u. 8-er Asci	2	327	514
10/1	farblos, gelbe Flecken	kein Wuchs	normal	3	380	595
10/4	schattierte Pigmentierung	dunkel-grau normale Wuchsr.				6
10/11	schwarz, keine Lufthyphen	kein Wuchs				6
11/2	schwarz, wenig Lufthyphen	schwarz, nor- male Wuchsr.		4	411	648
11/4	farblos, keine Lufthyphen	gelb, normale Wuchsr.				5, 6, 8
14/2	normal	normal	hellgrau	7	571	898
16/3	schwarz, dichte Lufthyphen	rosa	normal	9	631	1058

Tabelle 7: Beschreibung einiger bei Kreuzungen i viv (Jungwuchs) x wild aufgetretener morpho-
logischer Mutanten von Todospora anserina. (Einzelheiten im Text)

1: 8/1 = irregularis, Beschreibung s. Tabelle 2 und Text

nicht durch und haben keinen negativen Einfluß auf die Lebensdauer. Eine hohe spontane Mutationsrate muß also nicht unbedingt zum Absterben eines Stammes führen.

b) Infektionsversuche :

Wie bereits ausführlich beschrieben, war ein wesentliches Ergebnis der Arbeiten von Marcou der Nachweis, daß Seneszenz mütterlich vererbt wird, und daß sie durch Anastomosen übertragen werden kann, daß also ein infektiöses Prinzip existiert. Dieses Prinzip vermehrt sich nach Übertragung auch in jungen Hyphenabschnitten sehr rasch und führt zur morphologisch sichtbaren Seneszenz. Bei den langlebigen Doppelmutanten sind in diesem Zusammenhang zwei Hauptursachen der Langlebigkeit denkbar:

- (1) bei ihnen ist ein wesentlicher Schritt bei der Bildung dieses infektiösen Prinzips gestört, so daß es in den Hyphen gar nicht oder zumindest nicht in aktiver Form auftritt;
- (2) das infektiöse Prinzip wird normal gebildet, aber seine Vermehrung bis zur kritischen Konzentration oder seine Ausprägung werden verhindert.

Um diese Frage zu klären, wurde untersucht, ob i viv - Myzelien infizierbar sind, bzw. ob das infektiöse Prinzip unter dem Einfluß von i viv - Kernen zur Ausprägung gelangt oder nicht.

Dazu wurden nach der von Marcou (1961) beschriebenen Methode im hängenden Tropfen Anastomosen zwischen kurzen Hyphenabschnitten von i viv - und seneszenten Wildstammkulturen hergestellt. Nach ca. 12 - 15 h cytoplasmatischem Kontakt wur-

de die Anastomose mit einem Mikroskalpell durchtrennt, die beiden (inzwischen weitergewachsenen) Hyphenfragmente jeweils zwei- bis dreimal unterteilt, und jedes Bruchstück einzeln in Nährlösungstropfen zu Mikrokulturen herangezogen. Diese wurden dann auf festes Nährmedium überführt und ihr Seneszenzpunkt bestimmt. Als Kontrolle dienten Anastomosen zwischen seneszenten und juvenilen Wildstamm-Kulturen verschiedenen Kreuzungstyps. Die Ergebnisse lassen sich wie folgt zusammenfassen:

(1) Die Übertragbarkeit des infektiösen Prinzips mit der beschriebenen Methode von seneszenten auf juvenile Hyphenabschnitte konnte durch die Kontrollexperimente bestätigt werden.

(2) Seneszente i viv - Kulturen wurden (in insgesamt sieben unabhängigen Versuchen) in keinem einzigen Fall erhalten. Dieses negative Resultat könnte so interpretiert werden, daß die i viv - Stämme immun gegen das Seneszenzprinzip sind. Dabei muß aber berücksichtigt werden, daß aufgrund des hohen experimentellen Aufwandes nur eine begrenzte Anzahl von Versuchen durchgeführt werden konnte; außerdem ist nicht sicher, ob das infektiöse Prinzip wirklich in die Hyphen des i viv - Stammes gelangt ist, da über die Art bzw. Richtung des Plasmaaustausches keine allgemeingültige Aussage gemacht werden kann.

Generell ist mit dieser Versuchsanordnung eine negative Beweisführung, d.h. ein Beweis für die Nichtausprägung des infektiösen Prinzips trotz Übertragung, nicht möglich. Deshalb wurde versucht, auf einem völlig anderen Weg diesen Nachweis

zu führen:

Dabei wurde das Phänomen der mütterlichen Vererbung der Seneszenz ausgenutzt (s. Abb. 2): Überschwemmt man einen seneszenten Wildstamm mit Spermastien eines juvenilen Stammes des anderen Kreuzungstyps, so enthält ein bestimmter Prozentsatz der entstehenden Perithezien (bei dem hier verwandten Stamms₁ etwa 10 - 15 %) ausschließlich seneszente Sporen, d.h. diese keimen zu Myzelien mit stark reduzierter Lebensdauer aus. Asci aus der Nachkommenschaft einer solchen Kreuzung enthalten also entweder vier "juvenile" oder vier "seneszente" Sporen, je nachdem, ob sie aus einem "juvenilen" oder "seneszenten" Perithezium stammen; eine Segregation innerhalb eines Ascus tritt nie auf. Darauf basierend wurde folgender Versuch durchgeführt:

Seneszenten Wildstamm-Myzel wurde mit Spermastien von einem i viv - Stamm des anderen Kreuzungstyps überschwemmt. Aus der Nachkommenschaft wurden 190 normale viersporige Asci isoliert, jeweils einer pro Perithezium. 31 dieser Asci waren vom Typ 6 (s. Tab. 3), d.h. sie enthielten zwei i viv- und zwei Wild-Sporen. Bei jeder dieser Sporen wurde der Seneszenzpunkt des entstehenden Myzels bestimmt. Wie zu erwarten, waren die meisten der Asci (23) "juvenil", d.h. die Wild-Sporen keimten zu Myzelien mit normaler Lebensdauer (25 d) und die i viv -Sporen zu langlebigen Myzelien aus (über 60d). Bei 6 Asci starben die entstehenden Wildmyzelien bereits nach wenigen Tagen ab; diese Asci enthielten also das infektiöse Prinzip, stammten also aus "seneszenten" Perithezien. Aus den beiden i viv - Sporen dieser Asci ent-

standen aber völlig normale, langlebige Myzelien, obwohl auch in ihnen das Prinzip vorhanden sein mußte.

Bei zweien der 31 Asci starben auch die Myzelien mit i viv-Morphologie frühzeitig ab. Eine genetische Analyse zeigte aber, daß sie eine zusätzliche Mutation enthielten, die in den langlebigen i viv - Stämmen nicht nachgewiesen werden konnte. Vermutlich ist das vorzeitige Absterben dieser Stämme also auf die Wirkung dieser Mutation zurückzuführen; es ist allerdings nicht auszuschließen, daß in diesen Fällen die "Immunität" der i viv- Myzelien durchbrochen worden ist.

Der Versuch beweist also, daß die Doppelmutante i viv trotz massiver Infektion in der Lage ist (zumindest in den meisten Fällen), die Ausprägung oder Vermehrung des infektiösen Prinzips zu verhindern, d.h. praktisch immun gegen dieses Prinzip ist.

c) Ausprägung im Heterokaryon:

Anhand der bisher geschilderten Versuche konnte nicht geklärt werden, ob i viv-Kerne die Ausprägung oder Entwicklung des infektiösen Prinzips aktiv unterdrücken, oder ob sie einen für diese Ausprägung oder Entwicklung nötigen Faktor nicht bereitstellen können. Dieses Problem wurde untersucht an Stämmen, die i viv- und Wildkerne nebeneinander enthalten, sog. "Cis"-Heterokaryen (Blaich u.Esser 1969).

Diese erhält man leicht aus der Nachkommenschaft einer i viv x wild - Kreuzung: die großen Sporen des Ascustyps 1 (s.Tab.3) enthalten jeweils einen Wild- und einen Doppelmutantenkern.

Siebzehn solcher Heterokaryen wurden isoliert und ihr Seneszenzpunkt (in jeweils drei Parallelansätzen) ermittelt. Es ergab sich ein Durchschnittswert von $25,8 \pm 1,1$ Tagen,

also keine signifikante Abweichung von der Lebensdauer des Wildstammes. Parallel wurden jeweils die "kleinen", homokaryotischen Wildsporen und i viv - Sporen der betreffenden Asci getestet. Diese zeigten die für den jeweiligen Genotyp charakteristische Lebensdauer ($25,1 \pm 1,4$ bzw. über 60 d). Bei diesen Untersuchungen ist allerdings zu berücksichtigen, daß die beiden Kerne in derartigen Heterokaryen nicht immer im Verhältnis 1:1 vorliegen wie z.B. in den Dikaryen der Basidiomyceten (Raper 1966).

Die Standardmethode zur Stabilisierung der Kernverhältnisse, nämlich die Markierung beider Kerne mit unterschiedlichen Auxotrophien und Verwendung eines Minimalmediums, auf dem der Stamm nur bei Anwesenheit beider Kernarten (durch Komplementation) wachsen kann, konnte hier nicht angewandt werden, weil keine Auxotrophievarianten von P.anserina zur Verfügung standen, und weil solche Mutanten vermutlich auch nicht ohne Einfluß auf die Lebensdauer wären.

Daß im vorliegenden Fall die Ergebnisse nicht auf eine Kernentmischung, d.h. ein Überwiegen von Wildkernen zurückzuführen sind, ergibt sich aus folgenden Beobachtungen:

(1) Die "Cis"-Heterokaryen haben einen Mischphänotyp, unterscheiden sich also morphologisch deutlich von den i viv- und Wild-Homokaryen. Eine Veränderung dieser Morphologie während des Langwuchses wurde nicht beobachtet.

(2) Aufgrund des hohen Postreduktionswerts des Kreuzungstyps bei P.anserina (s.o.) besaßen die beiden Kerne der untersuchten Heterokaryen jeweils verschiedenen Kreuzungstyp, waren also selbstfertil. Daher wurden von allen auf Langwuchs getesteten Myzelien Selbstungsperithezien gebildet, und zwar auch in bereits seneszenten Myzelbereichen, d.h. auch in diesen mußten beide Kernarten vorhanden sein.

Die i viv-Kerne verhalten sich also in diesen Heterokaryen rezessiv, d.h. ihre lebensverlängernde Wirkung prägt sich bei gleichzeitiger Anwesenheit von Wildkernen nicht aus. Offensichtlich ist diese Wirkung also passiver Natur, da die i viv - Kerne die Ausprägung bzw. Vermehrung des infektiösen Prinzips anscheinend nicht fördern können. In den Heterokaryen schaffen aber die gleichzeitig anwesenden Wildkerne die zu dieser Vermehrung bzw. Ausprägung nötigen Bedingungen, und der Stamm stirbt nach normaler Lebensdauer ab.

4. Zusammenfassung

Die Ergebnisse der genetischen Untersuchungen lassen sich wie folgt zusammenfassen:

(1) Außer incoloris und vivax haben noch eine Reihe weiterer Gene in bestimmten Kombinationen erheblichen Einfluß auf die Lebensdauer. Einige dieser Gene sind eng gekoppelt, es kommen aber auf fast allen Kopplungsgruppen Gene mit einer solchen Wirkung vor.

(2) Beim Langwuchs von i viv-Myzelien tritt eine Vielzahl von spontanen Mutanten auf; diese führen aber im Normalfall nicht zum Absterben des Myzels, sondern können sich auf Dauer nicht durchsetzen.

(3) I viv- Stämme sind praktisch immun gegen das infektiöse Prinzip; dies ist offenbar darauf zurückzuführen, daß sich dieses Prinzip in homokaryotischen i viv - Myzelien nicht vermehren bzw. ausprägen kann, weil eine vom Wildkern ausgeübte Funktion vom i viv - Kern nicht wahrgenommen werden kann.

B. Physiologische Untersuchungen

1. Einführung :

Wie eingangs bereits erwähnt, ist über die physiologischen Ursachen der Seneszenz bei Podospora anserina bisher wenig bekannt. Es gibt ein Seneszenz - übertragendes bzw. - induzierendes "infektiöses Prinzip", das offensichtlich im Cytoplasma lokalisiert ist. Welche stoffliche Natur dieses Prinzip hat, wie es entsteht, sich vermehrt und ausprägt, ist unbekannt. Um einen allgemeinen Einstieg zur Untersuchung dieses Problemkreises zu erhalten, gibt es u.a. zwei mögliche Versuchsansätze:

(1) Man versucht, durch geeignete Methoden und Umweltbedingungen den Verlauf der Seneszenz zu beschleunigen, um eventuell durch die Art der wirksamen Faktoren Rückschlüsse auf die Beteiligung bestimmter physiologischer Vorgänge ziehen zu können.

Dieser Ansatz wurde z.B. von Holliday (1969) verfolgt, der fand, daß durch Zusatz von Aminosäureanaloge die Lebensdauer von P.anserina-Stämmen verkürzt werden kann. Er schließt daraus, daß die Seneszenz durch Anhäufung von Fehlern verursacht wird (s.O.). Auch die Arbeiten zur Seneszenz bei Neurospora crassa, die wegen der potentiellen Langlebigkeit dieser Art an kurzlebigen Mutanten durchgeführt worden sind (Lit. Tab. 1), sind in diesem Zusammenhang zu nennen.

Folgerungen aus derartigen Versuchen sind aber mit Vorbehalt zu betrachten, da keineswegs klar ist, ob die induzierte "Seneszenz", d.h. das vorzeitige Absterben eines Stammes, die gleichen physiologischen Ursachen hat wie die natürlich auftretende Seneszenz. Es ist wahrscheinlich nicht schwer,

mit recht unspezifischen Mitteln ein komplexes biologisches System aus dem Gleichgewicht und damit zur Funktionsunfähigkeit zu bringen.

(2) Man kann umgekehrt versuchen, positiven Einfluß auf die Lebensdauer eines Stammes zu nehmen, d.h. den Verlauf der Entwicklung der Seneszenz zu verzögern oder gar ganz anzuhalten.

In diesem Zusammenhang sind z.B. die Versuche von Marcou (1961) und Smith u. Rubenstein (1973 b) zu nennen, die durch zeitlich begrenzte starke Reduktion des Stoffwechsels eine vorübergehende "Juvenilisierung" von P.anserina - Stämmen erreichten (s.o.).

Dieser Versuchsansatz hat den Vorteil, daß etwaige Ergebnisse eindeutig zu interpretieren sind: wenn durch Eingriff in einen bestimmten Stoffwechselbereich positiver Einfluß auf die Lebensdauer genommen werden kann, so heißt das, daß dieser Bereich eine Rolle bei der Entwicklung der Seneszenz spielt. Im folgenden soll versucht werden, hauptsächlich mit Hilfe dieses zweiten Versuchsansatzes einen Einblick in die der Seneszenz zugrundeliegenden physiologischen Vorgänge zu erhalten, und zwar unter folgenden Gesichtspunkten:

- (1) Welche stoffliche Natur hat das infektiöse Prinzip?
- (2) Welche physiologischen Vorgänge sind bei seiner Entstehung, Vermehrung und Ausprägung beteiligt?

Dazu werden zunächst Versuche zur lebensverlängernden Wirkung verschiedener Stoffwechsel-Inhibitoren dargestellt, dann Infektionsversuche an Protoplasten, und schließlich Untersuchungen zum Einfluß der Katabolitrepression auf die Lebensdauer.

2. Inhibitorversuche

a) Screening von Inhibitoren mit positivem Einfluß auf die Lebensdauer :

Smith und Rubenstein (1973 b) fanden, daß durch kurzzeitiges Wachstum auf einem Nährmedium mit Cycloheximid und Kaliumcyanid in stark Wachstum-hemmenden Konzentrationen eine vorübergehende "Juvenilisierung" von Fodospora-Myzelien zu erreichen ist. Versuche von Dr.T.Itho (unveröffentlicht) in unserem Institut zeigten darüberhinaus, daß auch durch Behandlung von Myzelstückchen mit Tetracyclinen eine (wenn auch geringfügige) Lebensverlängerung erzielt werden kann.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde daraufhin ein Screening-Programm durchgeführt, in dessen Verlauf eine Reihe von Inhibitoren mit bekanntem Angriffspunkt in der Zelle auf ihre lebenverlängernde Wirkung untersucht wurden. Diese Stoffe wurden den Myzelien im Nährmedium kontinuierlich zugeführt, wobei stets ein breiter Konzentrationsbereich getestet wurde, um die optimal wirksame Konzentration des jeweiligen Inhibitors zu erfassen. Die in diesen Versuchsreihen erhaltenen Daten sind in Tabelle 8 aufgeführt. Die Ergebnisse lassen sich wie folgt zusammenfassen:

(1) Bei fast allen getesteten Inhibitoren kommt es bei höherer Konzentration zu einer Veränderung der Morphologie und einer starken Reduktion der Wachsrates, d.h. eine Aufnahme dieser Stoffe in die Zelle ist sichergestellt.

(2) Einige Inhibitoren haben tatsächlich lebenverlängernde Wirkung, wobei diese Verlängerung wenige Tage (z.B. Mucidermin) oder sogar einige Monate (Ethidiumbromid, Tiamulin)

Inhibitor	Spezifität	Literatur	Konzentration (M/l)	Wuchsrates (mm/d)	Seneszenzpunkt	Morphologie
Kontrolle	-	-				
Ethidiumbromid	ds-DNA, spezif. mt. (interkalierend)	Waring 1968		7,6 ± 0,1	24,4 ± 0,3	grau-schwarz
			10 ⁻⁵	8,2 ± 0,1	107,0 ± 18,5	normal
			5x10 ⁻⁵	7,7 ± 0,1	69,2 ± 4,7	normal ²
			10 ⁻⁴	7,5 ± 0,1	275,8 ± 64,7	normal ³
			2x10 ⁻⁴	7,0 ± 0,3	73,5 ± 2,6	wenig Lufthyphen
Antridin		Waring 1968	3x10 ⁻⁴	5,9 ± 0,4	45,0 ± 1,7	keine Lufthyphen, Pigmentb. gestört
			5x10 ⁻⁴	nicht angewachsen		
			10 ⁻³			
			10 ⁻⁶	6,6 ± 0,3	16,4 ± 0,8	normal
			10 ⁻⁵	6,1 ± 0,2	21,2 ± 1,2	
			5x10 ⁻⁵	6,7 ± 0,2	25,4 ± 2,7	
			10 ⁻⁴	6,5 ± 0,1	24,8 ± 1,2	
			5x10 ⁻⁴	4,7 ± 0,1	51,0 ± 4,3	wenig Lufthyphen
			7,5x10 ⁻⁴	4,6 ± 0,1	67,8 ± 14,3	keine Lufthyphen, Pigmentb. gestört
			10 ⁻³	2,6 ± 0,1	94,6 ± 7,4	keine Lufthyphen, rhythm. Pigmentb.

1: N = 16C 2: ein Ansatz über 560 d (nicht berücksichtigt) 3: ein Ansatz über 620 d (nicht ber.)

Inhibitor	Spezifität	Literatur	Konzentration (g/l)	Wuchsrate (mm/d)	Exerescenzpunkt (d)	Morphologie
<u>Acriflavin</u>	spezif. für mt - D ₁ A	Waring 1968	10 ⁻⁵	7,0 ± 0,2	134,6 ± 50,3	normal
			5x10 ⁻⁵	7,7 ± 0,1	79,8 ± 1,3	
			10 ⁻⁴	7,0 ± 0,2	85,0 ± 10,9	
			2x10 ⁻⁴	4,3 ± 1,2	41,4 ± 12,6	
	dc-D ₁ A (inter-valierend)		5x10 ⁻⁴	nicht angewachsen		keine Luftthyphen, rhythm. Pigmentb.
<u>Actinomycin</u>		Miller u. Crothers 1968	5x10 ⁻⁷	7,2 ± 0,1	22,4 ± 1,0	normal
			10 ⁻⁶	6,7 ± 0,2	42,2 ± 4,1	
			5x10 ⁻⁶	4,8 ± 0,2	74,8 ± 4,5	
			2x10 ⁻⁵	3,0 ± 0,3	56,8 ± 8,5	
						keine Luftthyphen, schwarz pigment.
Cordycepin	mt-DNA-Synthese	Nyblær et al. 1971	10 ⁻⁶	7,7 ± 0,1	21,6 ± 0,8	normal
			10 ⁻⁵	7,8 ± 0,1	19,2 ± 0,6	
			5x10 ⁻⁵	6,3 ± 0,0	24,6 ± 1,5	
			10 ⁻⁴	1,0 ± 0,0	10,0 ± 0,1	
						keine Luftthyphen, gestörte Pigmentb.
Ananitin	RNA-Polymerase (Eukaryonten)	Wieland 1972	5x10 ⁻⁴	nicht an, erwachsen		normal
			10 ⁻⁷	7,4 ± 0,1	22,3 ± 0,3	
			10 ⁻⁶	7,4 ± 0,0	21,2 ± 0,3	
			10 ⁻⁵	7,6 ± 0,1	22,0 ± 0,1	
			4x10 ⁻⁵	7,3 ± 0,0	22,7 ± 0,7	

Inhibitor	Spezifität	Literatur	Konzentration (µ/l)	Wuchsrates (mm/d)	Seneszenzpunkt (d)	Morphologie
<u>Rifampicin</u>	RNA-Polymerase (Prokaryonten)	Kessler u. Hartmann 1977	10 ⁻⁵ 10 ⁻⁴ 5x10 ⁻⁴ 10 ⁻³ 5x10 ⁻³	6,5 ± 0,1 5,7 ± 0,3 5,6 ± 0,1 5,5 ± 0,1 4,4 ± 0,1	13,6 ± 0,2 11,2 ± 0,2 12,6 ± 0,6 26,8 ± 0,9 59,0 ± 2,7	normal
<u>Kanamycin</u>	Prokaryonten-ribosom 30-S-Untereinheit	Pestka 1971	10 ⁻⁴ 5x10 ⁻⁴ 10 ⁻³ 3x10 ⁻³ 10 ⁻⁵ 10 ⁻⁴ 5x10 ⁻⁴ 7,5x10 ⁻⁴ 10 ⁻³	7,2 ± 0,1 7,7 ± 0,1 7,6 ± 0,1 7,2 ± 0,2 7,9 ± 0,1 7,2 ± 0,1 7,3 ± 0,1 7,0 ± 0,1 3,4 ± 0,4	25,2 ± 2,7 39,7 ± 1,9 55,2 ± 5,5 66,4 ± 9,7 21,2 ± 1,0 20,0 ± 0,9 26,8 ± 2,6 29,2 ± 1,2 49,6 ± 2,7	
<u>Neomycin</u>			10 ⁻⁵ 10 ⁻⁴ 5x10 ⁻⁴ 7,5x10 ⁻⁴ 10 ⁻³	7,9 ± 0,1 7,2 ± 0,1 7,3 ± 0,1 7,0 ± 0,1 3,4 ± 0,4	21,2 ± 1,0 20,0 ± 0,9 26,8 ± 2,6 29,2 ± 1,2 49,6 ± 2,7	
<u>Streptomycin</u>			10 ⁻⁵ 10 ⁻⁴ 10 ⁻³ 3x10 ⁻³	7,8 ± 0,1 7,5 ± 0,1 7,0 ± 0,1 5,8 ± 0,2	33,4 ± 2,1 36,6 ± 1,2 39,6 ± 2,8 59,4 ± 3,9	

1 : Ergebnisse sehr schwankend je nach Inhibitorcharge; bei zwei von fünf unabhängigen Versuchsreihen (mit je fünf Parallelsätzen) wesentlich stärkerer Effekt, teilweise über 100 d (nicht berücksichtigt)

Inhibitor	Spezifität	Literatur	Konzentration (M/l)	Wuchsrate (mm/d)	Seneszenzpunkt (d)	Morphologie
Tetracyclin	Prokaryonten- ribosom	Pestka 1971	5×10^{-6}	$7,2 \pm 0,1$	$24,6 \pm 0,2$	normal
			5×10^{-5}	$7,4 \pm 0,1$	$27,0 \pm 0,3$	
	30-S-Untereinheit		10^{-4}	$4,7 \pm 0,1$	$24,2 \pm 1,4$	wenig Luftthyphen
			5×10^{-4}	nicht angewachsen		
Chlor- amphenikol		Pestka 1974	10^{-6}	$7,6 \pm 0,1$	$21,2 \pm 0,7$	normal
			10^{-5}	$7,5 \pm 0,1$	$19,6 \pm 0,7$	
			10^{-4}	$3,1 \pm 0,3$	$16,0 \pm 0,1$	schwarz, rhythm.
			5×10^{-4}	$2,3 \pm 0,4$	$11,0 \pm 0,1$	
			10^{-3}	$2,1 \pm 0,3$	$18,0 \pm 0,1$	
Tiamulin	Prokaryonten- ribosom 50-S-Untereinheit	Riedl 1976	6×10^{-6}	$7,5 \pm 0,1$	$25,5 \pm 1,0$	normal
			$3,3 \times 10^{-5}$	$7,3 \pm 0,1$	$32,2 \pm 2,3$	
			6×10^{-5}	$6,9 \pm 0,1$	$41,8 \pm 2,4$	wenig Luftthyphen
			$3,3 \times 10^{-4}$	$5,2 \pm 0,1$	$286,3 \pm 26,7$	
			6×10^{-4}	$2,8 \pm 0,3$	$119,7 \pm 5,3$	
Pleuro- mutilin		Riedl 1976	$3,3 \times 10^{-4}$	$6,3 \pm 0,1$	$22,8 \pm 2,6$	normal
			6×10^{-4}	$4,0 \pm 0,1$	$14,8 \pm 1,2$	
				nicht angewachsen		starke Pigmentb.
			$3,3 \times 10^{-3}$			

Inhibitor	Spezifität	Literatur	Konzentration ($\mu\text{g/l}$)	Wuchsrates (mm/d)	Seneszenzpunkt (d)	Morphologie
<u>Puromycin</u>	Prokaryonten- ribosom	[	5×10^{-5}	$7,5 \pm 0,2$	$19,0 \pm 1,0$	normal
	50-S-Untereinheit		10^{-4}	$7,1 \pm 0,2$	$24,0 \pm 2,3$	
			5×10^{-4}	$6,4 \pm 0,2$	$31,8 \pm 1,8$	
Emetin		]	10^{-3}	$5,2 \pm 0,1$	$39,3 \pm 1,2$	normal
			10^{-5}	$7,5 \pm 0,2$	$26,6 \pm 0,4$	
			10^{-4}	$4,3 \pm 0,2$	$20,8 \pm 0,2$	
Actidion (Cycloheximid)		]	5×10^{-4}	$2,6 \pm 0,1$	$20,0 \pm 0,1$	wenig Luftthyphen schwarz, rhythm. stark gestörter Wuchs, gelbe Pig- mentausscheid.
			10^{-3}	$0,1 - 0,2$	-	
		]	10^{-6}	$7,3 \pm 0,1$	$23,0 \pm 1,1$	normal
			3×10^{-6}	$3,6 \pm 0,4$	$10,3 \pm 2,0$	
			10^{-5}	$4,7 \pm 0,4$	$23,0 \pm 4,1$	
Cligomycin		]	3×10^{-5}	$3,1 \pm 0,3$	$22,6 \pm 0,1$	schwarz, keine Luftthyphen
			10^{-4}	$1,4 \pm 0,8$	$19,0 \pm 12,0$	
		]	10^{-7}	$6,6 \pm 0,1$	$21,8 \pm 2,1$	normal
			10^{-6}	$4,5 \pm 0,2$	$18,6 \pm 2,0$	
			10^{-5}	$3,7 \pm 0,2$	$23,6 \pm 1,5$	
	Oxidative Thophorylierung	Ryrie 1975				schwarz, rhythm.

Inhibitor	Spezifität	Literatur	Konzentration (g/l)	Wuchsrate (mm/d)	Seneszenzpunkt (d)	Morphologie
Dinitrophenol	Oxidative Phosphorylierung	Green 1977	10^{-6}	$8,5 \pm 0,1$	$17,6 \pm 0,7$	normal
			10^{-5}	$8,4 \pm 0,1$	$15,0 \pm 0,8$	
			10^{-4}	nicht angewachsen		
Antimycin		Rieske 1967	3×10^{-7}	$3,9 \pm 0,1$	$16,8 \pm 1,2$	schwarz, rhythm. stark gestört
			10^{-6}	$1,7 \pm 0,1$	$33,4 \pm 6,3$	
			5×10^{-6}	1,0	-	
			10^{-7}	$7,3 \pm 0,2$	$21,3 \pm 1,0$	
Nucidermin	Atmungskette	Subik et al. 1974	10^{-6}	$7,1 \pm 0,3$	$24,0 \pm 1,1$	normal
			10^{-5}	$6,5 \pm 0,3$	$41,5 \pm 2,2$	
			2×10^{-5}	$7,1 \pm 0,1$	$31,4 \pm 1,8$	
			5×10^{-5}	$4,6 \pm 0,2$	$25,8 \pm 1,8$	
			10^{-4}	nicht angewachsen		

Tabelle 8: Einfluß verschiedener Stoffwechsel - Inhibitoren auf die Lebensdauer, Wachstumsrate und Morphologie von Podospira anserina. Inhibitoren mit lebensverlängernder Wirkung sind unterstrichen. Experimentelle Einzelheiten siehe Material und Methoden.

betragen kann.

(3) Diese lebensverlängernde Wirkung ist nicht durch eine Reduktion der Wachsrates, d.h. ein allgemeines Drosseln des Stoffwechsels bedingt; viele Inhibitoren wirken bereits in Konzentrationen, die Wachsrates und Morphologie nicht beeinträchtigen (Ethidiumbromid, Acriflavin, Streptomycin, etc.), während in anderen Fällen trotz verringerter Wachsrates die Myzelien sogar vorzeitig absterben (Cordycepin, Emetin, Actidion, etc.).

(4) Das wichtigste Ergebnis betrifft die Spezifität der wirksamen Inhibitoren, die schematisch in Abbildung 5 dargestellt ist. Nur zwei Gruppen von Inhibitoren wirken erheblich lebensverlängernd:

a) DNA - Farbstoffe, wobei Ethidiumbromid, Acriflavin und Acridin in Pilzzellen eine spezifische Affinität für mitochondriale (oder andere nicht-Kern-gebundene) DNA besitzen (Hixon et al. 1975; Bonanchang et al. 1969; Zylber et al. 1969; Fukuhara u. Kujawa 1970), während Actinomycin sowohl an der Kern-DNA (Reich et al.) als auch an der mitochondrialen DNA (Grant u. Poulter 1973) angreifen kann.

Diese Farbstoffe "interkalieren" in die DNA-Moleküle, d.h. sie setzen sich zwischen benachbarte Basenpaare, indem sie an beide Einzelstränge kovalent binden (Tsai et al. 1975; Müller u. Crothers 1968); dadurch werden die physikalischen Eigenschaften der DNA erheblich verändert und Replikation und Transcription stark behindert (Waring 1968). Häufig treten dabei irreversible Schäden auf, bis hin zum Verlust ganzer DNA-Stücke, was die mutagene Wirkung dieser Stoffe erklärt (Goldring et al. 1970; Mattick u. Nagley 1977).

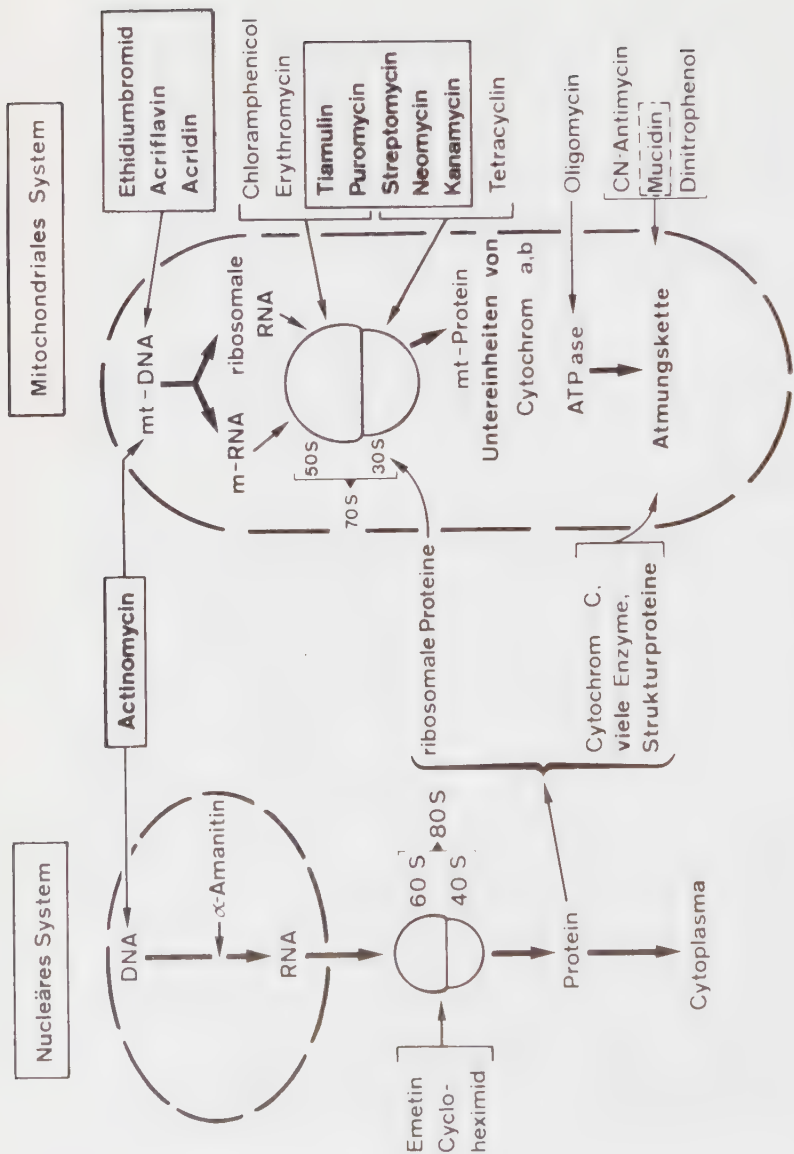


Abbildung 5 : Schematische Darstellung der Proteinsynthese-Systeme einer eukaryotischen Zelle. Die Angriffsstellen von Inhibitoren sind durch entsprechende Pfeile gekennzeichnet. Inhibitoren mit lebensverlängernder Wirkung sind dunkel unterlegt. (Einzelheiten s. Tab.8).

b) Translationsinhibitoren, die an Ribosomen vom Prokaryontentyp angreifen; diese kommen in eukaryotischen Zellen in Mitochondrien und Plastiden vor (Lloyd 1974). Der Wirkungsmechanismus der fünf Antibiotika dieser Gruppe ist etwas unterschiedlich:

Die sog. Aminoglykosid-Antibiotika Streptomycin, Kanamycin und Neomycin binden an die kleine Untereinheit des Ribosoms und verursachen Ungenauigkeiten bei der Proteinsynthese (Pestka 1971); sie können dadurch Suppressor-ähnliche Wirkung haben (Gorini u. Kataja 1964).

Puromycin greift an der großen Untereinheit des Ribosoms an: es wird durch seine Ähnlichkeit mit dem Aminoacyl-Adenosin-Ende der t-RNA in die Peptidketten eingebaut; dies führt zu vorzeitigem Kettenabbruch und damit zu erheblichen Störungen in der Proteinsynthese (Pestka 1971).

Tiamulin, ein Derivat des von dem Basidiomyceten Pleurotus mutilis gebildeten Pleuromutilins (Riedl 1976), bindet an die große Untereinheit des Ribosoms in der Nähe des sog. "A-site" (Aminoacyl-t-RNA-Bindungsart) und führt dadurch ebenfalls zu einem Kettenabbruch, da keine freien Aminoacyl-t-RNA-Moleküle mehr an das Ribosom binden können (Hodgin u. Högenauer 1974).

Tiamulin wirkt als Antibiotikum spezifisch gegen Mycoplasmen (Högenauer 1975), bakterienähnliche Organismen ohne feste Zellwand. Aufgrund dieser Tatsache, und weil die oben erwähnten Vorversuche von Dr. T. Itho eine lebensverlängernde Wirkung von Tetracyclinen gezeigt hatten - diese sind ebenfalls spezifisch gegen Mycoplasmen (Smith 1972) -, wurde zunächst eine Beteiligung solcher Organismen bei der Entstehung der Seneszenz bei Podospora diskutiert (Esser u. Tudzynski 1977); weitere Anhaltspunkte hierfür konnten aber nicht gefunden werden.

b) Einfluß des Myzelalters auf die Inhibitorwirkung:

Bei den im Rahmen des Screening-Programms durchgeführten Versuchsreihen wurden stets frisch sexuell-regenerierte, d.h. sehr junge Stämme von Podospora anserina verwandt. Um zu untersuchen, ob auch bei älteren Myzelien noch eine Lebensverlängerung möglich ist, wurden von auf normalem Mais-Malz-Medium angezogenen Kulturen zu verschiedenen Zeitpunkten Impfstücke entnommen und auf ein Medium überführt, das einen Inhibitor mit lebensverlängernder Wirkung in optimaler Konzentration enthielt. Wie in Abbildung 6 exemplarisch für Tiamulin und Acriflavin dargestellt, zeigt sich, daß eine Korrelation zwischen Myzelalter und lebensverlängernder Wirkung der Inhibitoren besteht: es gibt einen Zeitpunkt, von dem ab das Auftreten der Seneszenzsymptome nicht mehr verhindert werden kann, einen "point of no return". Dieser Punkt ist allerdings für die verschiedenen Inhibitoren nicht identisch: bei Tiamulin (Abb. 6 a) liegt er etwa 10 d vor dem Seneszenzpunkt; später übertragene Impfstücke wachsen auf dem Tiamulinhaltigen Medium nur noch kurze Zeit. Acriflavin (Abb. 6 b) und auch Ethidiumbromid (nicht dargestellt) wirken dagegen noch unmittelbar vor dem Auftreten der Seneszenzsymptome lebensverlängernd; allerdings haben die kurz vor dem Seneszenzpunkt entnommenen Impfstücke eine längere "lag-Phase", d.h. sie keimen erst 5 - 6 Tage nach dem Übertragen auf das Acriflavin-haltige Medium aus.

Aufgrund dieser Versuche kann man bei Podospora anserina drei Wachstumsphasen unterscheiden: eine "juvenile" Phase, in der alle getesteten Inhibitoren lebensverlängernd wirken, eine

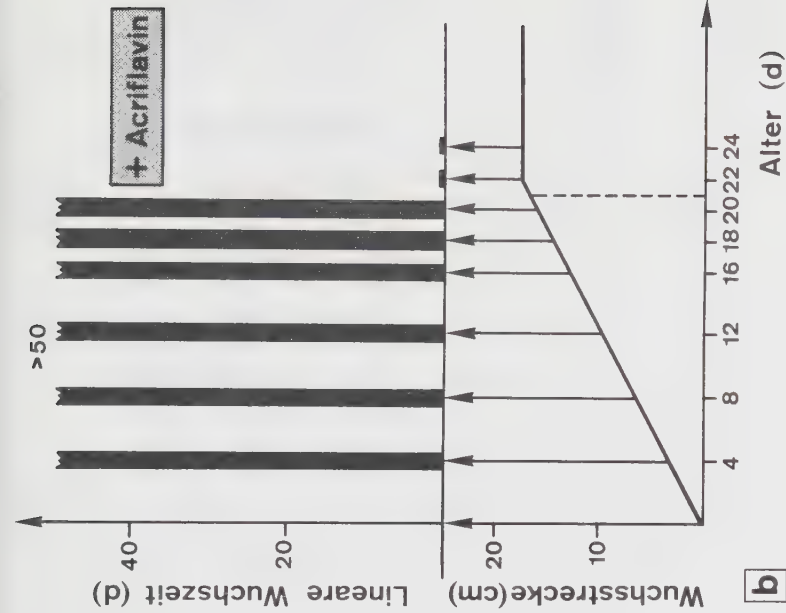
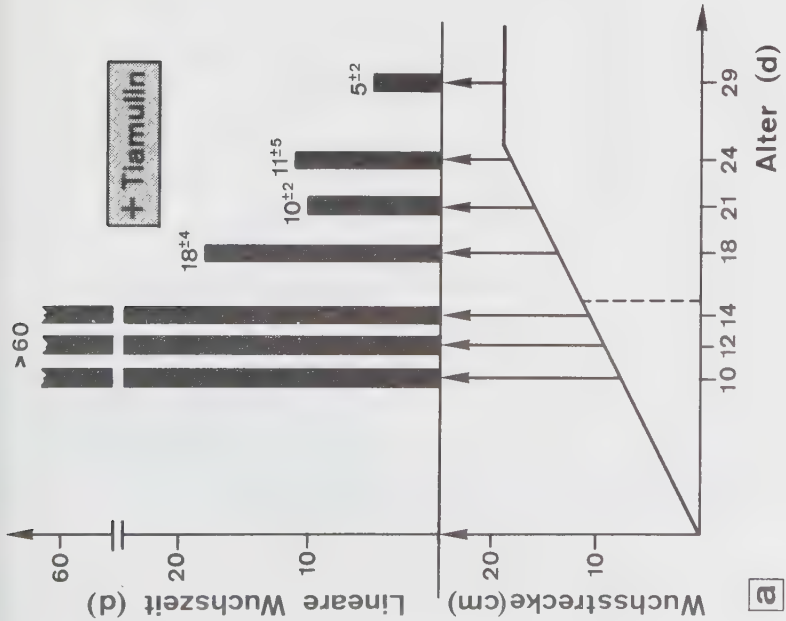


Abbildung 6 : Abhängigkeit der Lebensverlängernden Wirkung von Tiamulin (a) und Acriflavin (b) vom Myzelalter. Der untere Diagrammteil zeigt jeweils die Wuchskurve des Myzels ohne Inhibitorzusatz, der obere Teil gibt die lineare Wuchszeit von zu verschiedenen Zeiten entnommenen Impfstücken auf Inhibitor-haltigem Medium an. (Einzelheiten im Text)

" praeseneszente", die vom Schwellenwert für Tiamulin bis zum Seneszenzpunkt reicht, und in der nur DNA-Farbstoffe lebenverlängernd wirken, und eine "seneszenzente" Phase, in der kein Inhibitor mehr wirkt.

c) Therapieversuche :

Im Hinblick auf die stark lebenverlängernde Wirkung einiger Inhibitoren stellt sich die Frage, ob es möglich ist, Stämme von Podospora anserina zu heilen, d.h. vom infektiösen Prinzip auf Dauer zu befreien und damit potentiell unsterblich zu machen. In diesem Zusammenhang wurde untersucht, wie sich Myzelien, die längere Zeit unter Inhibitoreinfluß gewachsen waren, nach Entzug dieses Inhibitors verhielten. Dazu wurden von auf Inhibitor-haltigem Medium angezogenen Kulturen zu verschiedenen Zeiten Impfstücke entnommen und auf Inhibitor-freies Medium überführt. Abbildung 7 zeigt die Ergebnisse solcher Versuchsreihen mit Ethidiumbromid und Tiamulin (Acridin und Acriflavin führten zu ähnlichen Ergebnissen wie Ethidiumbromid). Es wird deutlich, daß die Myzelien nach Entzug des Inhibitors nur noch begrenzte Zeit weiterwachsen, also nicht geheilt sind. Die lineare Wuchszeit entspricht aber mindestens der normalen Lebensdauer, übertrifft diese in einigen Fällen sogar etwas. Anscheinend "zählt" die Wuchszeit unter Einfluß der Inhibitoren nicht: die Myzelien verhalten sich nach dem Entzug wie frisch regenerierte Stämme.

Bei Tiamulin (Abb.7 a) tritt allerdings bei Behandlungszeiten über einem Monat eine starke Abnahme der Wuchszeit auf Inhibitor-freiem Medium auf. Bei Ethidiumbromid

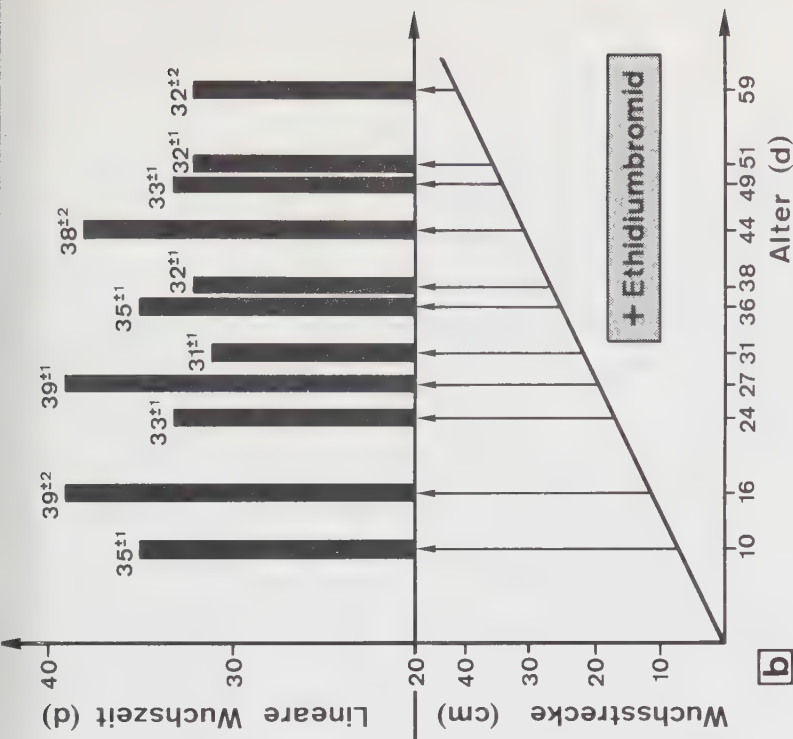
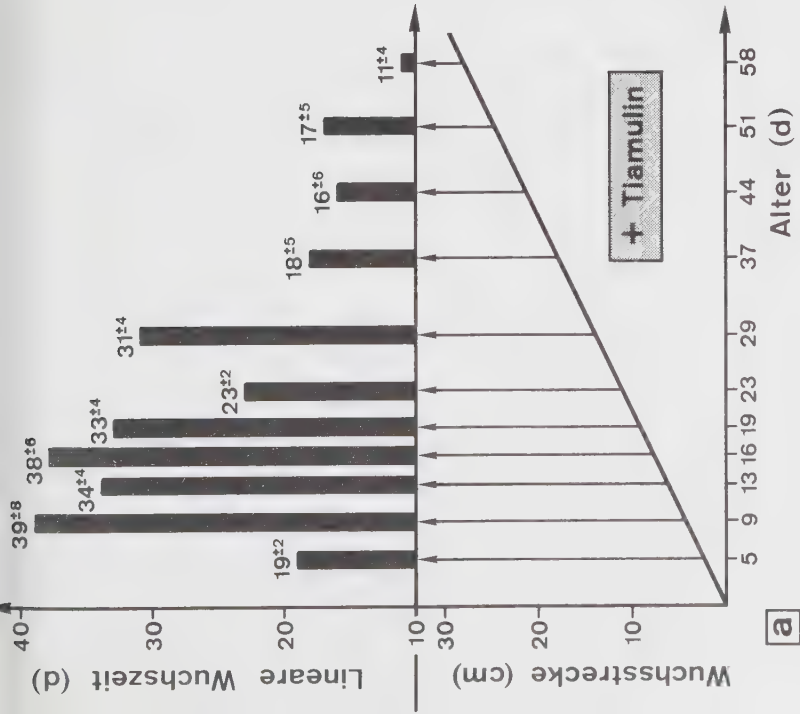


Abbildung 7 : Korrelation zwischen der Wuchszeit auf (a) Tiamulin- und (b) Ethidiumbromidhaltigem Medium und der Lebensdauer nach Entzug des Inhibitors. Der untere Diagrammteil zeigt jeweils die Wuchskurve auf Inhibitor-haltigem Medium, der obere Teil gibt die Lebensdauer zu verschiedenen Zeiten entnommener und auf Inhibitor-freies Medium überführter Impfstücke an. (a: $3,3 \times 10^{-4} \text{ M/l}$; b: $1,0 \times 10^{-4} \text{ M/l}$). Einzelheiten im Text.

(Abb. 7 b) ist dieser Effekt nicht zu beobachten; selbst nach 325 Tagen Wuchszeit eines Stammes auf $10^{-5}M$ Ethidiumbromid wurde nach Übertragung auf normales Maismedium eine Lebensdauer von 39 Tagen festgestellt.

Offensichtlich beschränkt sich die Wirksamkeit der Inhibitoren also auf eine Verhinderung der Ausprägung der Seneszenz; eine Beseitigung der Ursachen und damit eine Heilung scheint nicht möglich zu sein.

Allerdings wurden zu den oben beschriebenen Versuchen junge Myzelien verwandt, die ja nach Marcou (1961) das infektiöse Prinzip noch nicht enthalten. Um festzustellen, ob eventuell nach Freisetzung des Prinzips eine Heilung möglich ist, wurde die oben beschriebene Wirksamkeit von Ethidiumbromid und Acriflavin in der präseneszenten Phase ausgenutzt: von einer seneszent gewordenen Kultur wurden etwa 1 cm hinter der Wuchsf front Impfstücke entnommen und auf Ethidiumbromid- bzw. Acriflavin-haltiges Medium überführt. Von den dort angewachsenen Kulturen wurden nach einiger Zeit Impfstücke zurück auf Inhibitor-freies Medium gebracht und die jeweilige Lebensdauer bestimmt. Wie aus Tabelle 9 zu ersehen, wachsen die Kontrollimpfstücke, die direkt auf normales Maismedium überführt wurden, nur noch etwa ein bis zwei Tage, während bei einem Zwischenaufenthalt von etwa zwei Wochen auf Ethidiumbromid die Myzelien nach Übertragung auf Inhibitor-freies Medium noch durchschnittlich 10 Tage wachsen, 15 der 89 Ansätze sogar länger als 20 Tage. Bei dem (mit weniger Parallelansätzen) auf Langwuchsröhrchen durchgeführten Acriflavinversuch haben die "seneszenten" Myzelien nach etwa zwei Monaten Wuchs auf dem Inhibitor-haltigen Medium noch eine Lebenserwartung von etwa 16 Tagen.

Inhibitor	Anzahl Parallelansätze	Keimung nach Überimpfung auf Inh.-Medium	Aufenthalts- dauer (d)	Keimung nach (Rück-)Überimpf. auf Mais-Medium	Seneszenzpunkt (d)
Kontrolle	60	-	-	60	$1,5 \pm 0,2$
Ethidiumbromid (10^{-4} M/l)	150	99	10 - 15 ¹	89	$9,6 \pm 0,9^2$
Acriflavin (5×10^{-5} M/l)	20	7	60 - 65 ¹	6	$15,8 \pm 2,9$

1: Keimungsdauer sehr unterschiedlich 2: 15 Ansätze über 20 d!

Tabelle 9 : Verjüngende Wirkung von DNA - Inhibitoren auf senescentes Myzel von Podospora anserina.
(Experimentelle Einzelheiten im Text)

Diese Ergebnisse bekräftigen Marcous Aussage (s.o.), daß es möglich ist, bereits seneszenten Myzel wieder zu verjüngen, wobei auch bei diesem Versuchsansatz letztlich offenbleibt, ob diese Verjüngung durch Inaktivierung des infektiösen Prinzips oder durch Schaffung eines Selektionsvorteils für nicht infizierte Hyphensegmente erreicht wird. Eine "Heilung" ist aber auch mit diesem Verfahren nicht möglich, es gelingt also nicht, einen unbegrenzt vegetativ vermehrbaren Stamm zu erhalten.

In einer weiteren Versuchsreihe wurde die Frage untersucht, ob durch eine intensivere Behandlungsmethode eine nachhaltige, "therapeutische" Inhibitorwirkung erzielt werden kann. Dazu wurden senescente Myzelien im Mixer zerschlagen und 24 h mit Tiamulin in verschiedenen Konzentrationen inkubiert. Von jedem Ansatz wurde in 30 Parallelansätzen der jeweilige Seneszenzpunkt ermittelt. Es zeigte sich bei den behandelten Homogenaten eine gegenüber der unbehandelten Kontrolle etwas erhöhte durchschnittliche Lebensdauer, aber eine "Heilung" trat nicht auf (Esser u. Tudzynski 1977). Eine ähnliche Versuchsreihe, die mit Hilfe von Protoplasten durchgeführt wurde, wird in Kapitel 3 beschrieben.

d) Zusammenfassung :

Es konnte gezeigt werden, daß durch ständige Zufuhr bestimmter Inhibitoren eine erhebliche Lebensverlängerung bei Fodospora anserina-Stämmen erzielt werden kann, ohne daß Morphologie und Wuchsrate entscheidend verändert werden.

Zwei Gruppen von Inhibitoren wirken lebensverlängernd: DNA-spezifische Farbstoffe mit besonderer Affinität für mitochondriale DNA, und Inhibitoren der Proteinsynthese am prokaryotischen Ribosom, die mit hoher Wahrscheinlichkeit in

diesem System als Inhibitoren der mitochondrialen Proteinsynthese wirken. Der mitochondriale Stoffwechsel ist also offensichtlich an der Entwicklung oder Ausprägung der Seneszenz beteiligt.

Die Versuche zur Altersabhängigkeit der Inhibitorwirkung zeigen, daß bei Podospora anserina drei Wachstumsphasen unterschieden werden können: in der ersten, der "juvenilen" Phase, läßt sich das Eintreten der Seneszenz durch beide Inhibitorgruppen aufschieben; in der zweiten, der "präseneszenten" Phase, die sich morphologisch nicht von der ersten unterscheidet, wirken ribosomale Inhibitoren nicht mehr lebensverlängernd, sondern nur noch die an der DNA angreifenden Substanzen; sie beginnt etwa 10 Tage vor Eintritt der Seneszenz. In der "seneszenten" Phase schließlich hat keiner der Inhibitoren mehr lebensverlängernde Wirkung.

Lebensverlängerung scheint generell nur bei ständiger Anwesenheit der Inhibitoren möglich zu sein: nach Entzug dieser Stoffe tritt früher oder später der Tod ein; eine "Heilung" konnte mit keinem Versuchsansatz erreicht werden, höchstens eine "Juvenilisierung" von präseneszentem Myzel.

3. Untersuchungen an Protoplasten

a) Einführung:

Ein Hauptanliegen dieser Arbeit ist, wie eingangs erwähnt, das Seneszenz-übertragende "infektiöse Prinzip" näher zu charakterisieren. Die im vorigen Abschnitt geschilderten Inhibitorversuche haben starke Hinweise auf die Beteiligung

der mitochondrialen Proteinsynthese und extranukleärer DNA bei der Vermehrung bzw. Ausprägung dieses Prinzips ergeben. Eine Identifizierung irgendeines Faktors, z.B. eines mitochondrialen Proteins oder eines DNA-Moleküls, als "determinant d'senescence" ist aber nur möglich, wenn gezeigt werden kann, daß dieser Faktor in "gesunden" Myzelbereichen Seneszenz auslösen kann, d.h. infektiös ist. Dazu ist ein Testsystem nötig, mit dessen Hilfe man den "Infektiositätsgrad" eines Extraktes exakt angeben kann. Bei einem Hyphenpilz wie Podospira anserina treten dabei zwei Hauptschwierigkeiten auf (s. Ainsworth u. Sussman 1966):

(1) die relativ starke Zellwand behindert die Aufnahme hochmolekularer Substanzen erheblich;

(2) die Hyphenbereiche stehen alle miteinander in cytoplasmatischem Kontakt, eine Einzelzellanalyse ist also nicht ohne weiteres möglich.

Eine für ein solches Testsystem brauchbare, aber experimentell recht aufwendige Methode ist die Mikroinjektion, bei der mit Hilfe eines Mikromanipulators Extrakte direkt in isolierte Hyphenfragmente eingespritzt werden, und deren weitere Entwicklung verfolgt wird.

Mit dieser Methode wurde z.B. der Nachweis geführt, daß der Phänotyp verschiedener cytoplasmatischer Mutanten von Neurospora crassa durch isolierte Mitochondrien übertragen werden kann (Diacumakos et al. 1965).

Eine sehr elegante Methode, die sich für die Lösung dieses Problems anbietet, ist der heute bei Bakterien und pflanzlichen Zellen allgemein angewandte enzymatische Abbau der Zellwand, wobei bei entsprechender osmotischer Stabilisierung freie

"Protoplasten" (Klercker 1892) entstehen. Diese enthalten zwar meist noch Zellwandreste, nehmen aber sehr leicht hochmolekulare Substanzen auf und lassen sich vor allem einzeln wieder "regenerieren", d.h. sie bilden eine neue Zellwand aus und teilen sich normal weiter (Literatur f. Pilze bei Villanueva u. Acha 1971; f. höhere Pflanzen bei Constabel 1975).

Mit dieser Methode gelang z.B. die Aufnahme von Viren (Okuno et al. 1977) und DNA (Lurquin u. Kado 1977) in Zellen höherer Pflanzen, ja sogar die Einführung intakter Bakterien- (Giles u. Whitehead 1976) und Blaualgenzellen (Burgoon et al. 1976) in Pilzhyphen.

Für Podospora anserina wurde die Herstellung von Protoplasten mit Schneckenmagen-Enzym beschrieben (Belcour 1975); im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde aber ein nach DeVries und Wessels (1972) hergestelltes Enzymgemisch von *Trichoderma viride* benutzt (s. Material u. Methoden), mit dem eine bessere Ausbeute erzielt werden konnte. Im folgenden soll die Ausarbeitung eines Infektiositätstests auf der Grundlage der Protoplastenherstellung und seine Anwendung bei verschiedenen Problemen beschrieben werden.

b) Wuchspotentialanalyse mit Hilfe von Protoplasten:

Einem in Fernbachkolben in Oberflächenkultur angezogenen Myzel von Podospora anserina kann kein bestimmtes Alter zugeordnet werden, da es aus sehr verschieden alten Myzelbereichen besteht. Eine Möglichkeit der Charakterisierung eines solchen Myzels ist die Bestimmung der Lebensdauer einer Reihe von Subkulturen, die nach Homogenisierung der Kultur ent-

nommen werden. Ein wirklich exaktes Bild wäre aber nur durch die Bestimmung des Alters einer repräsentativen Anzahl von **Einzelsegmenten** ("Zellen") zu erhalten. Für eine solche "Wuchspotentialanalyse", wie sie im folgenden genannt werden soll, bietet sich die Verwendung von Protoplasten an; dabei treten allerdings eine Reihe von Problemen auf:

- (1) Werden ältere Myzelbereiche überhaupt bzw, in gleichem Ausmaß enzymatisch angegriffen wie junge ?
- (2) Regenerieren Protoplasten aus älteren Myzelteilen gleichzeitig und unter denselben Bedingungen wie solche aus jungen Bereichen?
- (3) Gibt es überhaupt "seneszente" Protoplasten, d.h. solche, die bald nach dem Auskeimen absterben, oder sind diese zur Regeneration garnicht mehr fähig?

Eine Vielzahl von Wuchspotentialanalysen mit Hilfe von Protoplasten, von denen drei exemplarisch in Abbildung 8 dargestellt sind, hat folgendes ergeben:

- (1) Die aus regenerierten Protoplasten einer Kultur von *Botrytis anserina* gewonnenen Myzelien haben sehr unterschiedliche Lebensdauer: es gibt offensichtlich neben sehr jungen auch ausgesprochen "seneszente" Protoplasten, d.h. solche, die normal regenerieren, aber nur noch wenige Tage weiterwachsen.
- (2) Es gibt keine Korrelation zwischen Regenerationszeitpunkt und Lebensdauer des entstehenden Myzels, d.h. ältere Protoplasten regenerieren nicht etwa später.
- (4) Analysiert man in mehreren Parallelansätzen das Wuchspotential eines bestimmten Myzels, so ergibt sich immer dieselbe, für diese Kultur also charakteristische, Verteilung der

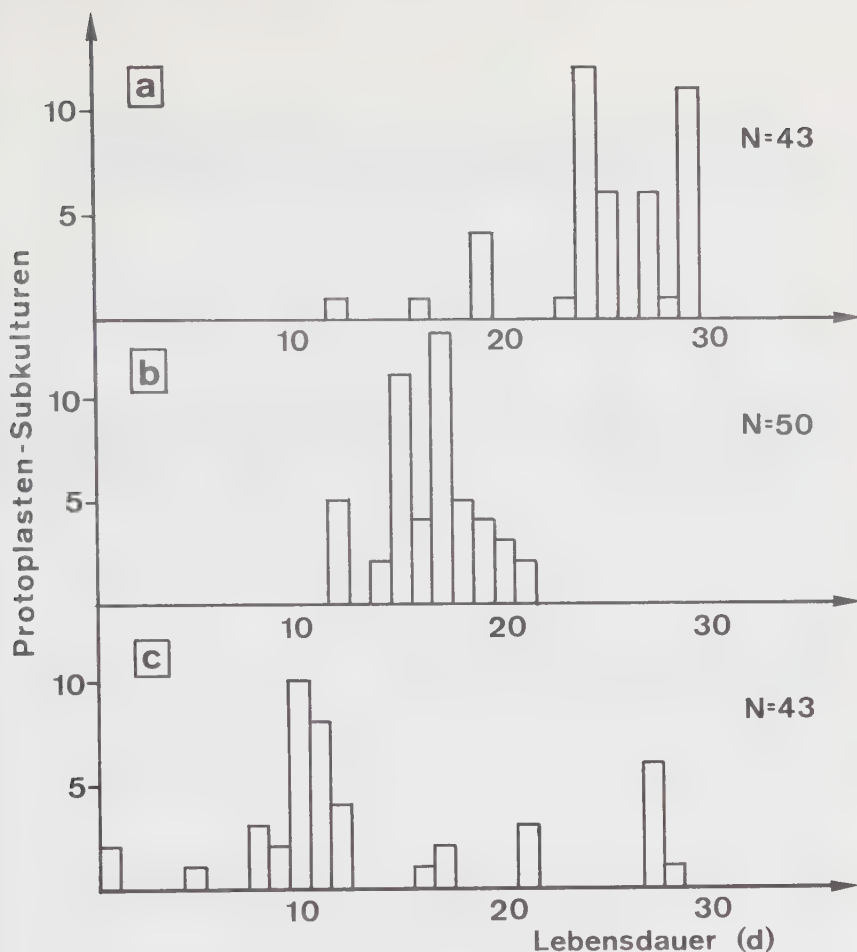


Abbildung 8 : Verteilung der Lebensdauer von Myzelien aus regenerierten Einzelprotoplasten in Abhängigkeit vom Alter des Ausgangsmyzels bei *P.anserina* : (a) sehr junge Kultur (Fernbachkolben direkt von Azetatplatten beimpft, 3 d Anzucht); (b) normale "juvenile" Kultur (6 d Wuchs auf Maisagarplatten, 4 d Fernbachkultur); (c) seneszente Kultur (Fernbach beimpft mit dem Randbereich einer seneszenten Kultur von Festmedium, 10 d Anzucht). Angegeben ist die Lebensdauer der aus den regenerierten Protoplasten gewonnenen Myzelien vom Zeitpunkt des Auskeimens

Experimentelle Einzelheiten s.Material u.Methoden.

Lebensdauer; dabei müssen allerdings jeweils mindestens 50 bis 60 Protoplasten isoliert werden, um statistische Schwankungen auszugleichen.

(4) Die Art dieser Verteilung ist abhängig vom Alter des Ausgangsmyzels. Abbildung 8 a zeigt, daß bei einem sehr jungen Myzel die meisten aus Protoplasten gewonnenen Subkulturen die Lebensdauer eines frisch regenerierten Stammes haben. Aus Abbildung 8 b und c ist zu erkennen, daß mit zunehmendem Alter des Myzels die Verteilungskurve nach links, also in Richtung auf geringere Lebensdauer, wandert. Interessant ist, daß auch in einer ausgesprochen seneszenten Kultur noch juvenile Protoplasten existieren und umgekehrt (Abb. 8 c bzw. b).

Mit Hilfe der Analyse von Protoplasten-Subkulturen läßt sich also jedem Myzel ein bestimmtes Wuchspotential zuordnen, d.h. eine charakteristische Verteilung der Lebensdauer von Einzelsegmenten.

Damit ist die Grundlage für den in Abbildung 9 schematisch dargestellten Infektiositätstest gegeben :

Protoplasten aus einer juvenilen Kultur werden mit Extrakten (Partikelfractionen, etc.) aus seneszentem Myzel behandelt und ihr Wuchspotential wird bestimmt. Als Kontrolle dienen unbehandelte Protoplasten; zusätzlich können auch Extrakte aus "juvenilen" Kulturen verwendet werden.

Dabei ist zu beachten, daß rein juveniles Myzel in den für die Gewinnung von Extrakten nötigen Mengen praktisch nicht zu erhalten ist ; außerdem sind solche Extrakte nicht unmittelbar vergleichbar, da es unmöglich ist, Anzucht- und Aufschlußbedingungen völlig gleich zu halten.

PROTOPLASTEN AUS JUVENILEN KULTUREN

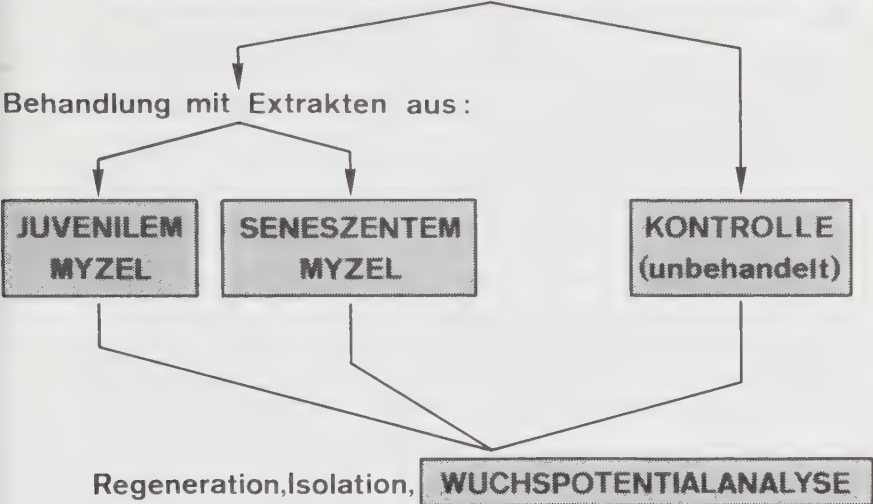


Abbildung 9 : Schematische Darstellung eines auf der Wuchspotentialanalyse von Protoplasten-Subkulturen basierenden Infektiositätstests bei Podospora anserina. Einzelheiten im Text.

Ein Extrakt wirkt dann infektiös, wenn nach Behandlung die Verteilungskurve gegenüber der Kontrolle in Richtung auf geringere Lebensdauer verschoben ist.

c) Infektionsversuche :

Aufgrund der oben erwähnten Hinweise auf die Beteiligung von Mitochondrien bzw. mitochondrialer oder anderer extranukleärer DNA an der Entwicklung der Seneszenz bei Podospora anserina wurde untersucht, ob diese Zellbestandteile aus seneszenten Hyphen in jungen Protoplasten vorzeitig Seneszenz auslösen können, d.h. eventuell mit dem infektiösen Prinzip gleichzusetzen sind. Dazu mußten zunächst Methoden zur Isolation von Mitochondrien bzw. DNA bei Podospora ausgearbeitet werden; diese Methoden mußten vor allem gerade bei seneszenten Zellen erfolgreich sein. Einzelheiten der ausgearbeiteten Verfahren sind im Abschnitt "Material und Methoden" dargestellt. Es sollen hier nur kurz einige wesentliche Punkte herausgestellt werden:

(1) Der Zellaufschluß mußte besonders schonend sein, da sowohl Mitochondrien als auch DNA-Moleküle sehr leicht mechanisch verletzt bzw. geschert werden. Als optimal für beide Probleme erwies sich ein Zerreiben des Myzels unter flüssigem Stickstoff, ohne Zusatz von Sand.

Ein vergleichbar gutes Aufschlußverfahren wäre die Protoplastenherstellung mit anschließender Lyse (Cryer et al. 1975); dieses wurde aber aufgrund der dafür benötigten grossen Enzymmengen und der damit verbundenen Kosten hier nicht angewandt.

(2) Die Mitochondrienisolation wurde mit Hilfe zweier Marker kontrolliert : der Cytochrom-C-Oxidase, einem an die innere Mitochondrienmembran gebundenen Enzym, und der Fumarase, einem Matrixenzym (Lloyd 1974). Es konnte gezeigt werden, daß die nach isopyknischer Zentrifugation in einem Saccharose-

gradienten erhaltene Mitochondrienfraktion intakt war, d.h. Aktivitäten beider Enzyme zeigte.

(3) Die mit dem beschriebenen Verfahren isolierte DNA ist sogenannte "bulk"-DNA, d.h. sie enthält nukleäre, mitochondriale und, falls vorhanden, andere extrachromosomale DNA-Moleküle, zusätzlich noch als Verunreinigungen RNA, Protein und Kohlenhydrate.

Eine weitere Reinigung dieser Präparationen kann durch Zentrifugation in einem präparativen Cäsiumchloridgradienten erfolgen; dies wurde in Zusammenarbeit mit Prof. P.Lemke, Pittsburgh, und Dr.U.Stahl durchgeführt (Stahl et al. 1978), kann aber im Rahmen dieser Arbeit nicht berücksichtigt werden.

Mit diesen so gewonnenen Extrakten wurden Protoplasten aus jungen Kulturen inkubiert, wobei die Inkubationsbedingungen etwas unterschiedlich waren (s.Material u.Methoden).

Bei der Behandlung mit isolierten Mitochondrien wurden ähnliche Bedingungen verwandt, wie sie für die Protoplastenfusion beschrieben worden sind (s.Stahl 1978); bei der DNA-Behandlung erwies sich eine für die Infektion von Bakterienprotoplasten mit Virus - DNA beschriebene Methode (Morita et al. 1977) als optimal.

Die insgesamt fünf mit Mitochondrien und vierzehn mit DNA durchgeführten (unabhängigen) Versuchsreihen erbrachten folgende Ergebnisse:

(1) Bei der Behandlung juveniler Protoplasten mit Mitochondrien aus seneszentem Myzel ergab sich bei vier von sechs durchgeführten Versuchen eine leichte Verschiebung der Lebensdauer-Verteilung, die sich auch in einer etwas unterschiedlichen durchschnittlichen Lebensdauer ausdrückte. "Alte" Mitochondrien können also die Lebenserwartung von jungen Pro-

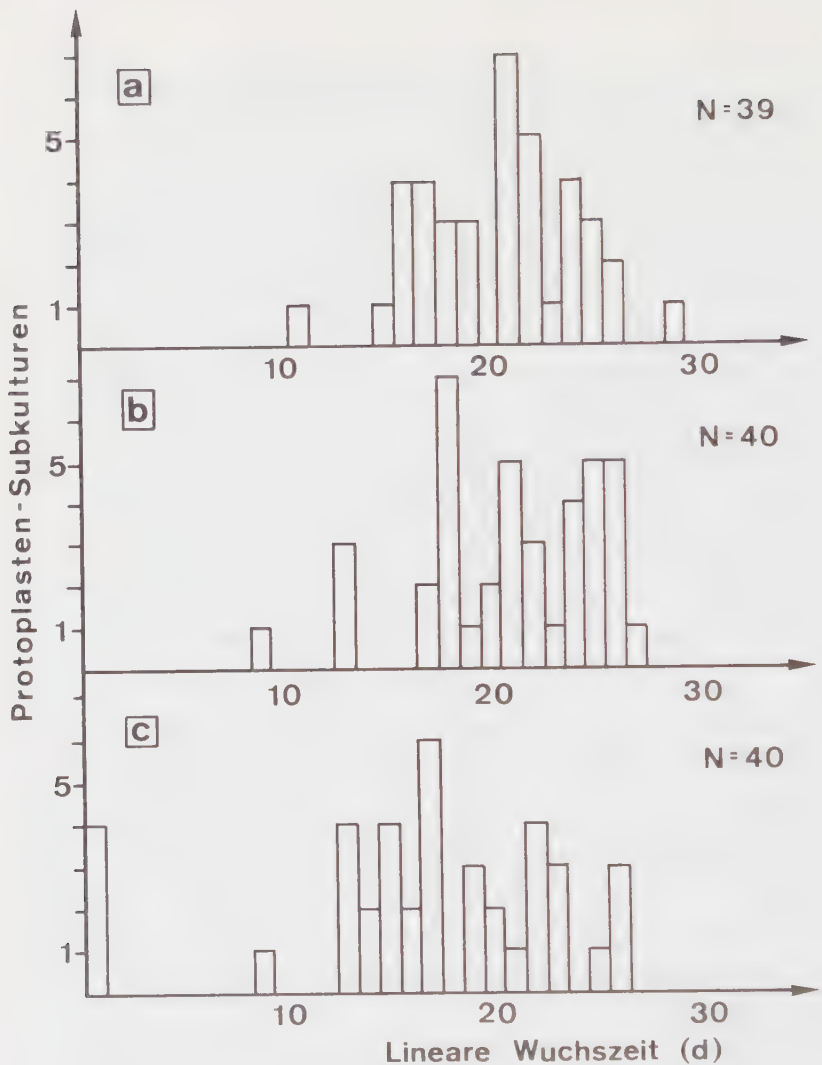


Abbildung 10: Einfluß von isolierter Gesamt-DNA aus seneszentem und juvenilem Myzel auf das Wuchspotential von Protoplasten einer juvenilen Kultur: a) Kontrolle (unbehandelt); b) Protoplasten inkubiert mit DNA aus juvenilem Myzel; c) Protoplasten inkubiert mit DNA aus seneszentem Myzel. (Experimentelle Einzelheiten s. Material und Methoden)

toplasten etwas reduzieren; dieser Effekt ist aber minimal und darf nicht überbewertet werden.

(2) Bei der Behandlung von Protoplasten mit Gesamt-DNA aus seneszentem Myzel ergaben sich sehr unterschiedliche Resultate, in einigen Fällen aber wesentlich eindeutigere als bei den Mitochondrienversuchen.

Die Analyse der verwendeten "bulk"-DNA (Caesiumchloridgradient, Elektrophorese, Elektronenmikroskop) zeigte, daß die Qualität der Aufarbeitungen sehr unterschiedlich war (Stahl, pers.Mitteilung). Dies kann verschiedene Ursachen haben, z.B. etwas unterschiedliche Kulturbedingungen, Scherung beim mechanischen Aufschluß oder Anwesenheit von Nukleasen. Jedenfalls werden damit die unterschiedlichen Resultate der Infektionsversuche verständlich.

In sieben Experimenten zeigte sich ein deutlicher Unterschied im Wuchspotential behandelter und unbehandelter Protoplasten. Abbildung 10 zeigt dies exemplarisch an einer Versuchsreihe; in diesem Fall sind die Unterschiede zwar nicht sehr stark, die Parallelbehandlung mit DNA aus jüngeren Kulturen zeigt aber sehr anschaulich, daß die lebenverkürzende Wirkung eines DNA-Extraktes abhängig ist vom Alter des Ausgangsmyzels.

In zwei Fällen aber konnte eine sehr krasse Wirkung erzielt werden, wie in Abbildung 11 exemplarisch dargestellt: es tritt nicht nur eine Verschiebung der Verteilungskurve nach links auf, sondern viele der behandelten Protoplasten sind offensichtlich "seneszent", d.h. sie keimen zwar völlig normal aus, wachsen aber nach Übertragung auf normales Maismedium nur noch wenige Tage oder überhaupt nicht mehr. Hier ist offensichtlich eine starke "Infektion" der Protoplasten aufgetreten.

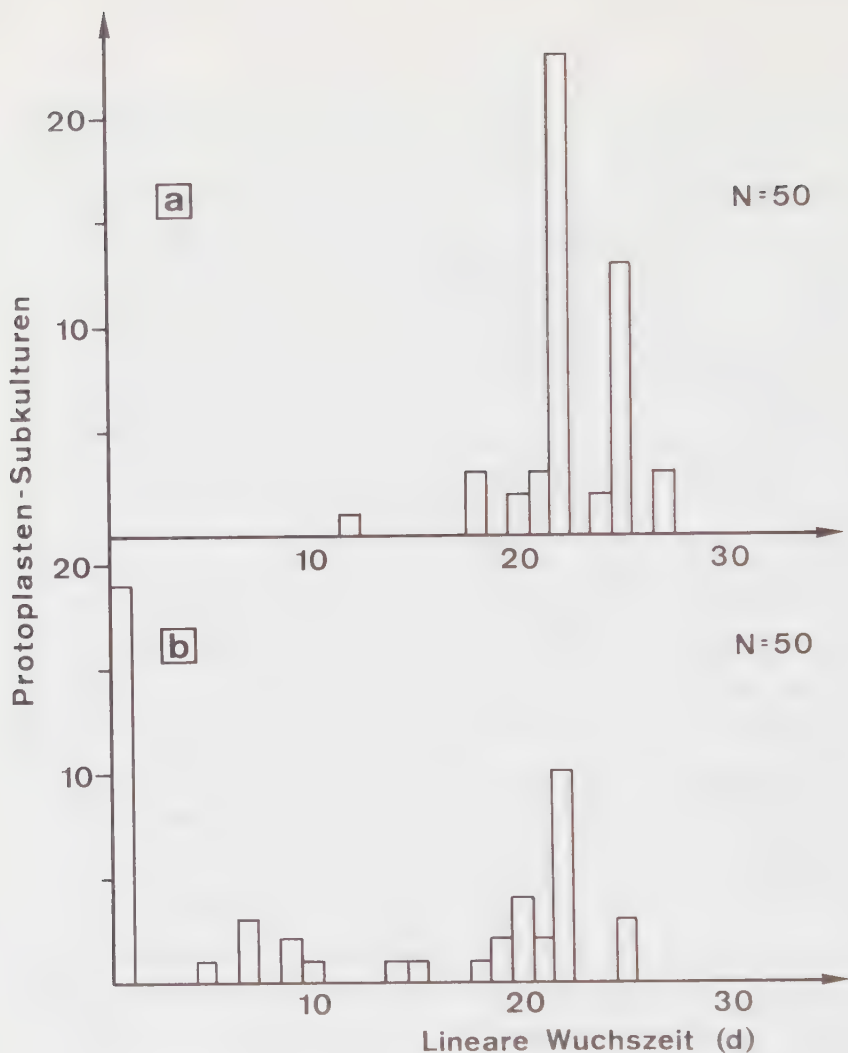


Abbildung 11 : Wirkung von isolierter Gesamt-DNA aus seneszentem Myzel auf das Wuchspotential von Protoplasten einer juvenilen Kultur:
 (a) unbehandelte Kontrolle
 (b) Protoplasten inkubiert mit DNA-Extrakt aus seneszentem Myzel
 (Experimentelle Einzelheiten s.Material u. Methoden).

Zusammenfassend läßt sich also sagen, daß DNA-Extrakte aus seneszentem Myzel Seneszenz auf Protoplasten aus jungen Kulturen übertragen können. Isolierte "seneszenzente" Mitochondrien können zwar auch lebenverkürzend wirken, aber in keinem Versuch konnten durch Infektion mit Mitochondrien wirklich "seneszenzente" Protoplasten erhalten werden.

Bei der Interpretation dieser Versuche müssen natürlich die eingangs im Hinblick auf die Versuche von Holliday angeführten Bedenken berücksichtigt werden. Während bei den dort diskutierten Untersuchungen aber synthetische Stoffe zur vorzeitigen Seneszenzauslösung benutzt wurden, handelt es sich bei diesen Versuchen um die Wirkung zelleigener Substanzen bzw. Organellen.

d) Therapieversuche:

Die Fähigkeit von Protoplasten, Fremdsubstanzen besonders leicht aufzunehmen, läßt sich auch für eine besonders intensive Inhibitorbehandlung ausnutzen (s.o.). Dazu wurden Protoplasten aus seneszentem Myzel hergestellt und 4 bis 12 h mit Tiamulin bzw. Ethidiumbromid in verschiedenen Konzentrationen inkubiert (Zimmertemperatur, Schüttler). Als Kontrollen dienten nicht mit Inhibitoren versetzte, aber sonst völlig gleich behandelte Protoplastensuspensionen. Es zeigte sich, daß die Regenerationsrate bei den behandelten Protoplasten generell sehr niedrig war (bei Ethidiumbromid oberhalb 10^{-4}M/l praktisch gleich Null); in einigen Fällen trat eine relative Verringerung der Anzahl "seneszenten" Protoplasten auf, was aber durchaus mit der toxischen Wirkung der Inhibitoren erklärt werden kann, für die wahrscheinlich diese Protoplasten besonders anfällig sind. Wie in den bereits beschriebenen Versuchen konnte auch hier eine Heilung nicht erreicht werden.

4. Untersuchungen zur Katabolitrepression

Im Rahmen von Versuchsreihen zur Optimierung der Mitochondrienausbeute bei Podospora anserina (s.o.) wurde beim Aus-testen verschiedener Nährmedien festgestellt, daß die Kohlenstoffquelle des Mediums Einfluß auf die Lebensdauer haben kann: Impfstücke von Myzelien, die in einem synthetischen Medium mit Natriumazetat als einziger Kohlenstoffquelle in Flüssigkultur angezogen worden waren (Kulturdauer etwa 18 d), zeigten nach Überführung auf normales Mais-Festmedium die Lebensdauer eines frisch regenerierten Myzels (25 - 28 d), d.h. sie waren offensichtlich während der Anzucht auf Azetat nicht gealtert.

Zum Vergleich : bei Anzucht auf Mais-Flüssigmedium beträgt die Lebensdauer von Impfstücken der Flaschenkultur noch maximal 10 bis 14 Tage.

Für dieses Phänomen gibt es zwei Erklärungsmöglichkeiten:

(1) Die Myzelmassenproduktion ist bei diesem Medium etwas geringer als bei Maismedium, der Alterungsvorgang läuft deshalb etwas langsamer ab. Marcou (1961) konnte z.B. zeigen, daß bei Verwendung sehr armer Medien die Lebensdauer von Podospora anserina - Stämmen etwas erhöht werden kann. Dem steht die oben beschriebene Beobachtung entgegen, daß das Myzel nach fast drei Wochen Anzucht auf Azetat noch eine völlig normale Lebensdauer auf Mais zeigt, d.h. überhaupt nicht gealtert ist.

(2) Zum anderen könnte die Tatsache eine Rolle spielen, daß Natriumazetat eine "nicht-reprimierende" Kohlenstoffquelle ist. Bei Pilzen scheint die Katabolitrepression (Magasanik (1961), d.h. die Reprimierung bestimmter Enzyme des Kohlen-

hydrat- und Energiestoffwechsels durch hohe Konzentrationen vergärbaren Zucker, eine ähnliche Bedeutung zu haben wie bei Bakterien (zusammenfassende Darstellung bei Lloyd 1974).

Dies konnte nicht nur für fakultativ anaerobe Hefen gezeigt werden (z.B. Ephrussi et al. 1956; Polakis u. Bartley 1965), sondern auch für einige obligat aerobe Pilze (z.B. Metzberg 1962; Ferrero et al. 1978).

Um diese Alternativen zu überprüfen, wurden verschiedene Kohlenstoffquellen hinsichtlich ihres Einflusses auf die Lebensdauer von Podospora anserina getestet. Wie aus den in Tabelle 10 zusammengefaßten Daten zu ersehen, tritt bei Verwendung von Natriumazetat, Glycerin, Melibiose und Raffinose (unabhängig von der Konzentration) eine deutliche Erhöhung der Lebensdauer auf. Bei einer Glukosekonzentration von 0,5 g/l wachsen die Myzelien ebenfalls länger als 90 Tage, bei höheren Konzentrationen tritt aber schon nach etwa 20 Tagen Seneszenz auf. Die Zucker Galaktose und Laktose können offensichtlich nur schlecht als Kohlenstoffquelle ausgenutzt werden; bei beiden tritt aber keine erhöhte Lebensdauer auf. Bei zwei Galaktose-Konzentrationen bleiben die Myzelien sogar schon nach wenigen Millimetern Wuchs stehen.

Diese Ergebnisse unterstützen die zweite der oben diskutierten Alternativen, nämlich das Vorliegen eines Glukoseeffektes, d.h. eine Beeinflussung der Entwicklung der Seneszenz bei Podospora anserina durch das Regulationssystem der Katabolitrepression:

(1) Die lebenverlängernd wirkenden Kohlenstoffquellen sind alle praktisch nicht reprimierend (Lloyd 1974), während bekannt ist, daß Laktose und Galaktose ähnlich wirken wie Glukose. Interessant ist vor allem auch die Konzentrationsab-

C - Quelle	Konzentration (g/l)	Wuchsrate (mm/d)	Sensenzpunkt (d)	Morphologie
Mais-Walz	-	7,6 ± 0,1	24,4 ± 0,3	grau - schwarz, helle Lufth.
Natrium- Azetat	2 5	6,4 ± 0,1 7,9 ± 0,4	109,4 ± 7,9 89,8 ± 11,7	dünner Wuchs, rötlich, grau überlaufen
Glycerin	10 20	8,1 ± 0,3 7,2 ± 0,2	96,8 ± 6,6 86,2 ± 4,7	fast farblos, rhythmisch, sehr flacher Wuchs hellbraun, rhythmisch
Melibiose	5 20	5,0 ± 0,1 5,9 ± 0,1	> 90,0	rötlich, rhythmisch rötlich, rhythmisch, grau überlaufen
Raffinose	5 20	4,6 ± 0,1 5,4 ± 0,1		hellbraun, rhythmisch
Glukose	0,5 5 20 50	7,3 ± 0,2 6,8 ± 0,1 6,8 ± 0,1 6,3 ± 0,1	23,6 ± 1,8 19,8 ± 0,6 19,6 ± 0,2	dunkelbraun, rhythmisch schwarzbraun, rhythmisch
Galaktose	5 10 20	- 6,6 ± 0,2 -	- 21,2 ± 2,3 -	nur ca. 5 mm Wuchs, schwarz, flach dünn, rhythmisch, schwarz pigmentiert nur ca 5 mm Wuchs schwarz, flach
Laktose	5 20	7,6 ± 0,1 7,7 ± 0,2	35,2 ± 1,6 34,0 ± 1,4	hellbraun, rhythmisch schwarzbraun, rhythmisch
Isferment	-	7,7 ± 0,2	25,0 ± 2,0	weiß, flacher Wuchs

Tabelle 10:

Einfluß der Kulturbedingungen und Zusammensetzung der Medien auf die Lebensdauer von *Indospora anserina*. (Kulturbedingungen und Zusammensetzung der Medien s. Material u. Methoden)
Die mit dem Symbol > gekennzeichneten Kulturen wuchsen noch bei Fertigstellung dieser Arbeit.

hängigkeit der Glukosewirkung: die Lebensdauer der Myzelien nimmt mit steigender Glukosekonzentration ab.

Diese Ergebnisse stimmen exakt mit den Daten von Reilly und Sherman (1965) überein; sie konnten zeigen, daß Melibiose und Raffinose die Glukoserepression der Cytochrom-A-Bildung aufheben können, Saccharose und Galaktose dagegen nicht (Saccharomyces cerevisiae).

(2) Die Morphologie ist auf allen Kohlenstoffquellen relativ ähnlich: die Myzelien sind rötlich bis hellbraun gefärbt, nur auf hohen Konzentrationen von Glukose und Laktose tritt eine verstärkte Pigmentbildung auf; der Wuchs ist generell relativ flach und rhythmisch. Die lebenverlängernde Wirkung einiger Kohlenstoffquellen ist also nicht gekoppelt mit einer deutlich schwächeren Myzelmassenproduktion. Dies läßt sich auch anhand der Wachsrates der Myzelien zeigen: zwar tritt bei Glycerin, Melibiose und Raffinose eine leichte Reduktion der Wachsrates (gegenüber der Mais-Kontrolle) auf, dasselbe trifft aber in gleichem, teilweise sogar stärkerem Maß auch für Galaktose und Laktose zu; bei 0,5 g /l Glukose ist die Wachsrates sogar größer als bei höheren Konzentrationen, bei Azetat ist sie vergleichbar mit der Kontrolle.

Die Anzucht auf dem natürlichen Substrat Pferdemist zeigt, daß auch auf diesem recht armen Medium die Myzelien eine normale Lebensdauer haben; auch hier ist der Wuchs sehr flach, d.h. die Myzelmassenproduktion relativ gering, und die Hyphen sind unpigmentiert.

Eine nähere Analyse der lebenverlängernden Wirkung von Azetat zeigt, daß Ähnlichkeiten mit der Wirkung ribosomaler Inhibitoren bestehen (s.o.): wie bereits erwähnt, hat ein von Azetat auf Mais überführtes Myzelium die Lebensdauer ei-

Substanz	Konzentration ($\mu\text{g/l}$)	Wuchsrate (mm/d)	Seneszenzpunkt (d)	Morphologie
Kontrolle	-	$7,6 \pm 0,1$	$24,4 \pm 0,3$	[grau-schwarz, helle Lufth. normal]
3'-5'-c-AMP	10^{-7}	$7,5 \pm 0,2$	$26,2 \pm 1,0$	
	10^{-6}	$7,4 \pm 0,2$	$29,8 \pm 1,8$	
	10^{-5}	$7,5 \pm 0,2$	$31,0 \pm 2,3$	
	2×10^{-5}	$6,4 \pm 0,2$	$47,8 \pm 2,2$	
	5×10^{-5}	$6,4 \pm 0,1$	$23,0 \pm 1,2$	
Theophyllin	10^{-4}	$7,5 \pm 0,1$	$20,2 \pm 1,2$	
	10^{-5}	$8,8 \pm 0,1$	$21,2 \pm 0,6$	
	10^{-4}	$8,0 \pm 0,1$	$32,8 \pm 1,0$	
	5×10^{-4}	$6,4 \pm 0,1$	$44,2 \pm 2,3$	
	10^{-3}	$6,9 \pm 0,1$	$21,6 \pm 0,5$	
Coffein	10^{-4}	$6,7 \pm 0,1$	$33,2 \pm 1,4$	
	5×10^{-4}	$6,7 \pm 0,1$	$32,2 \pm 1,4$	
	10^{-3}	$6,5 \pm 0,1$	$43,8 \pm 3,5$	

Tabelle 11 : Einfluß von c-AMP, Theophyllin und Coffein auf die Lebensdauer von *Podospira anserina*.
(Anzucht auf Malsmedium, experimentelle Einzelheiten s. Material u. Methoden). Signifi-
kant längere Wuchszeiten sind unterstrichen.

nes frisch regenerierten Stammes, ähnlich wie bei Tiamulin. Abbildung 12 zeigt, daß auch die Wirkung von Azetat abhängig ist vom Myzelalter: überträgt man Impfstücke von einer auf normalem Maismedium wachsenden Kultur auf synthetisches Medium mit Natriumazetat als Kohlenstoffquelle, so tritt von einem Alter der Ausgangskultur von etwa 14 Tagen ab keine lebensverlängernde Wirkung mehr auf; es gibt also auch hier einen "point of no return", eine physiologische Schwelle, die etwa mit der für Tiamulin zusammenfällt.

Eine wesentliche Rolle bei der bakteriellen Katabolitrepression spielt das c-AMP (Makman u. Sutherland 1965); bei Eukaryonten ist dessen Rolle noch nicht völlig geklärt. Bei einigen Hefen wurde gezeigt, daß bei hoher Glukosekonzentration im Medium der intrazelluläre c-AMP-Gehalt niedrig ist und umgekehrt (Van Wijk u. Konijn 1971; Sy u. Richter 1972), und daß man durch Zugabe von c-AMP die Glukoserepression mildern kann (Fang u. Butow 1970). Es gibt zwei Möglichkeiten, um den intrazellulären c-AMP-Spiegel zu heben: einmal durch Zugabe von c-AMP, oder durch Zugabe von Inhibitoren der c-AMP-Phosphodiesterase, einem c-AMP abbauenden Enzym, z.B. Coffein oder Theophyllin (s.z.B. Tsuboi u. Yanagishima 1973). Tabelle 11 zeigt den Einfluß von c-AMP, Coffein und Theophyllin auf die Lebensdauer von Podospira anserina. Alle drei Substanzen können die lineare Wachstumsphase signifikant verlängern, ohne Beeinträchtigung der Morphologie und Wachstumsrate: bei einer Konzentration von $2 \times 10^{-5} \text{ M/l}$ bei c-AMP, $5 \times 10^{-4} \text{ M/l}$ bei Theophyllin und 10^{-3} M/l bei Coffein tritt eine Lebensdauer von

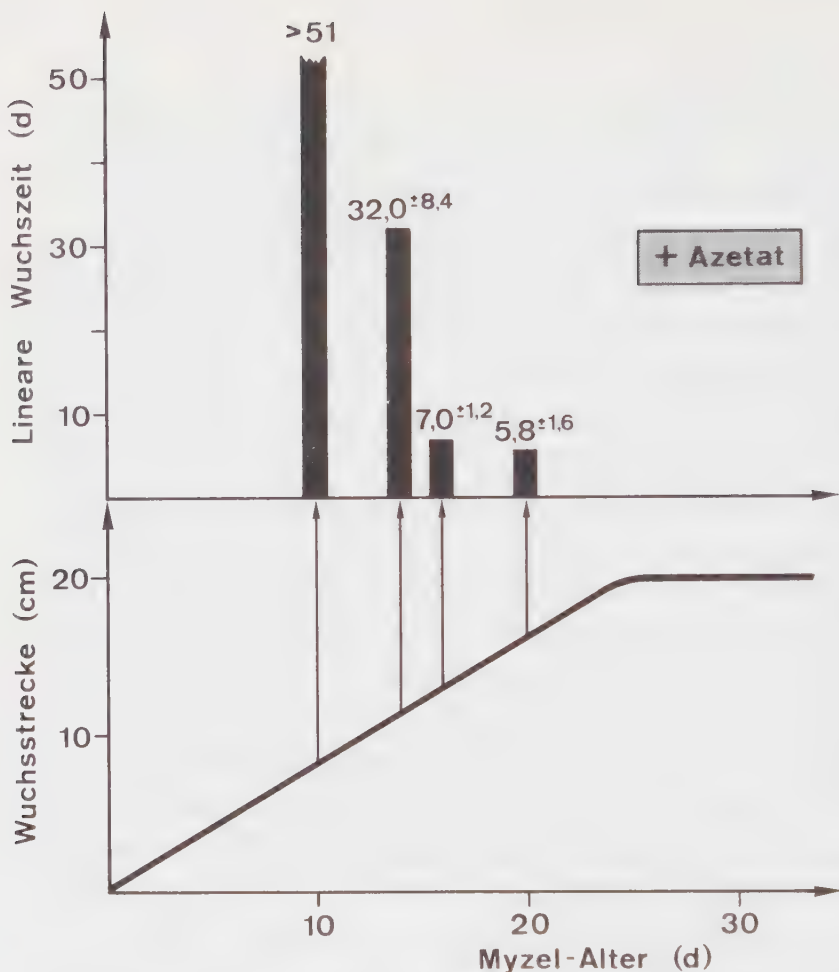


Abbildung 12 : Abhängigkeit der lebensverlängernden Wirkung von Azetat vom Myzelalter. Der untere Diagrammteil zeigt die Wuchskurve des Myzels auf normalem Mais-Medium, der obere Teil gibt die Wuchszeit von zu verschiedenen Zeiten entnommenen Impfstücken auf synthetischem Medium mit Natriumazetat als Kohlenstoffquelle an. (Einzelheiten im Text; s.a. Material und Methoden).

über 40 Tagen auf.

Wegen der ungeklärten Rolle von c-AMP in eukaryotischen Zellen dürfen diese Ergebnisse nicht überinterpretiert werden; sie passen aber zur Vorstellung eines Glukoseeffektes im vorliegenden Fall .

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß mit großer Wahrscheinlichkeit ein Einfluß der Katabolitrepression auf die Entwicklung der Seneszenz bei Podospora anserina vorliegt, da auf nicht reprimierenden Kohlenstoffquellen ein erheblich längeres Wachstum möglich ist. Der Wirkungsmodus dieser Lebensverlängerung weist Ähnlichkeiten mit dem von ribosomalen Inhibitoren auf, z.B. mit Tiamulin. C-AMP hat ebenfalls leichten Einfluß auf die Lebensdauer, was mit seiner Regulationsfunktion im Rahmen der Katabolitrepression erklärt werden könnte.

V. Diskussion

Die in dieser Arbeit dargestellten Versuche haben gezeigt, daß es auf erstaunlich vielfältige Weise möglich ist, die Lebensdauer von Fodospora anserina erheblich zu verlängern; der Alterungsprozeß läßt sich offensichtlich bei diesem Organismus auf sehr vielen Ebenen aufhalten, verzögern oder gar rückgängig machen. Es drängt sich dabei der Vergleich mit einem Differenzierungsprogramm auf, das nur dann abläuft, wenn alle erforderlichen physiologischen Faktoren und Umweltbedingungen vorhanden sind. Vor einer solchen übergeordneten Betrachtung des Seneszenzsyndroms bei Fodospora und dem Versuch einer Einordnung in die bestehenden Alternstheorien sollen aber zunächst die verschiedenen Ebenen im Einzelnen diskutiert werden, die auf den Seneszenzvorgang Einfluß haben; weiterhin soll versucht werden, die Ergebnisse mit Hilfe eines Denkmodells zusammenzufassen und zu erklären. Dabei soll die Infektiosität der Seneszenz bei Fodospora, d.h. die Existenz eines infektiösen Prinzip, Grundlage aller Überlegungen und Interpretationen sein.

Im Einzelnen ergibt sich aus den geschilderten Versuchen die Beteiligung folgender Zell- bzw. Stoffwechselbereiche:

A. Der Zellkern, oder genauer eine Anzahl nukleärer Gene, hat erheblichen Einfluß auf die Lebensdauer von Fodospora; dies ist aufgrund der zentralen Steuerungs- und Kontrollfunktion dieses Organells zu erwarten. Dabei sind folgende Ergebnisse hervorzuheben:

(1) Erstaunlich viele der untersuchten Gene können die Lebens-

dauer erheblich beeinflussen. Solch eine "polygenische" Kontrolle ist auch bei anderen Systemen cytoplasmatischer Vererbung beobachtet worden : der "Killer"-Phänotyp von Saccharomyces cerevisiae wird z.B. von mehr als 13 ungekoppelten Genen kontrolliert (Wickner u. Leibowitz 1976); auch der "Poky"-Phänotyp von Neurospora crassa wird von einer Vielzahl von Kerngenen beeinflusst (Kohout u. Bertrand 1976).

(2) Viele dieser Gene sind ungekoppelt; vier von ihnen liegen aber eng benachbart auf einer Region der Kopplungsgruppe III. Es liegt nahe, in diesem Fall eine Funktions- bzw. Regulationseinheit, ein sog. "Gen-Cluster", anzunehmen, wie es bei einer Reihe von Eukaryonten nachgewiesen werden konnte, so z.B. bei Neurospora crassa (Giles et al. 1967), Saccharomyces cerevisiae (Fink 1966), Coprinus radiatus (Gans u. Masson 1969), und auch bei Podospora anserina (Picard 1971; 1973). Überlegungen in dieser Richtung müssen aber solange spekulativ bleiben, bis über die physiologische Wirkung dieser Gene Näheres bekannt ist.

(3) Interessant ist ferner die synergistische Wirkung vieler dieser Gene. Eine erhebliche Erhöhung der Lebensdauer ist nur mit Doppelmutanten zu erreichen.

Eine Interpretation dieses Phänomens ist im Moment noch nicht möglich; auch in diesem Fall sind nähere Informationen über die physiologische Genwirkung nötig.

(4) Die Untersuchungen an der Doppelmutante i viv machen wahrscheinlich, daß in diesem Fall die Langlebigkeit auf eine Art passive Immunität gegen das infektiöse Prinzip zurückzuführen ist. Die Tatsache, daß i viv-Sporen aus "senes-

zenten" Asci zu völlig normalen Myzelien auskeimen, zeigt, daß sich das infektiöse Prinzip in Gegenwart des i viv-Kerns nicht ausprägen oder vermehren kann. Die rezessive Wirkung von i viv hinsichtlich der lebensverlängernden Wirkung in Heterokaryen mit dem Wildstamm deutet auf eine passive Natur dieser Immunität hin; dem infektiösen Prinzip fehlt hier ein für die Ausprägung bzw. Vermehrung nötiger Faktor, der vom normalen Wildkern produziert wird.

Bei dem oben erwähnten "Killer"-System von Saccharomyces cerevisiae ist bekannt, daß einige der beteiligten Kerngene die Replikation des cytoplasmatischen Erbträgers (in dem Fall doppelsträngige RNA), andere dessen Ausprägung verhindern (Wickner 1976). Ob i viv eventuell in eine dieser Gruppen einzuordnen ist, kann erst dann entschieden werden, wenn das infektiöse Prinzip endgültig identifiziert worden ist; im ersteren Fall, d.h. wenn die Vermehrung des Faktors beeinträchtigt würde, dürften i viv-Myzelien dieses Prinzip praktisch nicht enthalten.

(5) Die meisten der in die Untersuchungen einbezogenen Mutanten sind hinsichtlich ihrer Phenoloxidase-Produktion gestört. Es ist aber letztlich nicht geklärt, ob es sich um Strukturgene handelt, ob die Regulation der Laccase-Synthese selbst oder irgendwelche übergeordneten Regulationssysteme betroffen sind (Prillinger u. Esser 1977; Tudzynski 1975). Da darüberhinaus über die biologische Funktion der Laccasen nichts Sicheres bekannt ist (Molitoris 1976), läßt sich ein Bezug zu dem Effekt der Lebensverlängerung nicht ohne weiteres herstellen.

B. Die Mitochondrien scheinen ebenfalls eine ganz erhebliche Rolle bei der Entwicklung der Seneszenz zu spielen. Dies ist aufgrund der zentralen Rolle dieser Organellen für den Stoff-

wechsel eines obligat aeroben Pilzes (Lloyd 1974) zu erwarten; sie sind als die wichtigsten Träger extrachromosomaler DNA schon früh mit dem Seneszenzsyndrom bei Podospora in Verbindung gebracht worden (Sager 1972; Smith u. Rubenstein 1973b).

Der bisher einzige konkrete experimentelle Hinweis auf eine Beteiligung der Mitochondrien an der Ausprägung der Seneszenz ist die Beobachtung, daß das Cytochromspektrum seneszenten Hyphen geändert ist; es entspricht etwa dem von bekannten mitochondrialen Mutanten (Turner 1978). Marcou und Raynal (1978) konnten dagegen bei Anastomosenversuchen mit mitochondrialen Mutanten keine Kopplung der Übertragung von Seneszenz und mitochondrialen Markern feststellen. Dies könnte allerdings durch die hohe Rekombinationsfrequenz der mitochondrialen DNA bei Podospora bedingt sein (Belcour u. Begel 1975).

Im Rahmen dieser Arbeit konnten für eine Beteiligung der Mitochondrien bei der Entwicklung der Seneszenz bei Podospora anserina folgende Hinweise erbracht werden:

(1) Einige Inhibitoren der bakteriellen Proteinsynthese haben lebensverlängernde Wirkung. Da es für das Vorhandensein von prokaryotischen Fremdorganismen in den Hyphen von Podospora keinerlei Beweise gibt, kann mit großer Wahrscheinlichkeit angenommen werden, daß durch diese Inhibitoren die mitochondriale Proteinsynthese beeinträchtigt wird (Lloyd 1974). Der Wirkungsmechanismus dieser Inhibitoren ist sehr unterschiedlich (s.o.); auf eine eingehende Interpretation dieser Wirkung auf molekularer Ebene soll hier verzichtet werden, vor allem auch, weil keine völlige Identität zwischen bakteriellem und mitochondrialem System besteht (Lloyd 1974).

Ein interessanter Ansatzpunkt für eine weitere Analyse wäre z.B. die Tatsache, daß von den drei Antibiotika Chloramphenikol, Pleuromutilin und Tiamulin nur das letzte lebensverlängernd wirkt, obwohl alle drei einen sehr ähnlichen mo-

lekularen Wirkungsmechanismus haben (Högenauer 1975); Pleuromutilin unterscheidet sich sogar nur in einer Seitenkette von Tiamulin (Riedl 1976).

(2) DNA-Farbstoffe mit besonderer Spezifität für mitochondriale DNA, wie Ethidiumbromid und Acriflavin, wirken erheblich lebensverlängernd, ohne daß bei den wirksamen Konzentrationen Wachsrates und Morphologie beeinträchtigt werden.

Die Wirkung dieser Farbstoffe auf mitochondriale DNA ist sehr unterschiedlich bei verschiedenen Organismen: bei Saccharomyces cerevisiae induzieren sie durch irreversible Schädigung der mitochondrialen DNA die sog. "Petite"-Mutanten (Ephrussi et al. 1949), während bei Schizosaccharomyces pombe die RNA-Synthese und DNA-Replikation nur reversibel blockiert werden (Bandlow u. Kaudewitz 1974).

Es ist allerdings nicht auszuschließen, daß der Angriffspunkt dieser Inhibitoren im vorliegenden Fall primär andere extrachromosomale DNA-Moleküle sind; so kann Ethidiumbromid z.B. zur Eliminierung von Plasmiden aus Bakterien angewandt werden (Bonancharang et al. 1969). Dies ist insofern von besonderer Bedeutung, als kürzlich der Nachweis von Plamid-ähnlicher DNA in Extrakten aus senescentem Myzel von Podospora anserina gelungen ist (Stahl et al. 1978).

Allerdings ist bekannt, daß das erste bei Eukaryonten nachgewiesene Plasmid, die sog. 2-Mikron-DNA von Saccharomyces cerevisiae, widerstandsfähiger gegen Ethidiumbromid ist als die mitochondriale DNA, d.h. sie wird von "Petite"-induzierenden Konzentrationen nicht geschädigt (Clark-Walker 1972).

Zwischen den beiden bisher diskutierten Bereichen, Zellkern und Mitochondrien, besteht nach neueren Erkenntnissen ein sehr enger Zusammenhang. Es ist seit langem bekannt, daß die Mitochondrien nicht völlig autonom sind, sondern daß ein Groß-

teil der mitochondrialen Proteine vom Kern kodiert und im Cytoplasma synthetisiert wird; man nahm aber lange Zeit an, daß die in den Mitochondrien selbst synthetisierten Proteine nur in den Organellen selbst verwendet werden (Schatz u. Mason 1974). Diese Annahme läßt sich heute so nicht aufrecht erhalten: es konnte gezeigt werden, daß auch ein Export mitochondrialer Proteine ins Cytoplasma auftritt (Macklin et al. 1977). Eine aktive Einflußnahme der Mitochondrien auf den Zellstoffwechsel ist also durchaus denkbar und scheint auch in einigen wichtigen Bereichen vorzuliegen.

Von einigen Autoren wird ein mitochondrial kodierter Repressor postuliert, der die Synthese einiger Kern-kodierter mitochondrialer Proteine beeinflusst (Barath u. Küntzel 1972; Edwards et al. 1974); die Mitochondrien haben offensichtlich eine wichtige regulatorische Funktion im Rahmen der Katabolitrepression (s.u.); es gibt sogar einige experimentelle Hinweise auf eine Beteiligung dieser Organellen bei der Krebsentstehung (Roa u. Bose 1975; D'Agostino u. Nass 1976).

Eine Behinderung der mitochondrialen Proteinsynthese kann also erheblichen Einfluß auf den gesamten Stoffwechsel haben. Dies muß auch bei der Interpretation der Inhibitorversuche beachtet werden: die lebensverlängernde Wirkung dieser Stoffe bedeutet nur, daß das mitochondriale Protein-Synthesesystem an der Entwicklung der Seneszenz beteiligt ist, nicht aber unbedingt, daß in den Mitochondrien selbst die primäre Ursache der Seneszenz liegt.

Auch bei einer möglichen Beteiligung anderer extrachromosomaler DNA (Viren, Plasmide), ist ein Einfluß der Mitochondrien auf deren Ausprägung oder Entwicklung denkbar: einige Tier- und Pflanzenviren sind (zumindest in frühen

Stadien) mit den Mitochondrien assoziiert (Ostroumov 1977); für eine solche Assoziation , die aufgrund der Ähnlichkeit des bakteriellen und mitochondrialen Systems sehr plausibel wäre, gibt es für die oben erwähnte Plasmid- DNA bei Podospora noch keinerlei Hinweise. Aber auch die Replikation der mit Sicherheit nicht in den Mitochondrien lokalisierten "Killer"-RNA von S.cerevisiae unterliegt offensichtlich dem Einfluß der mitochondrialen Proteinsynthese (Wickner 1977).

C. Der dritte Bereich, der Einfluß auf die Ausprägung der Seneszenz bei Podospora hat, ist die Katabolitrepression.

Eine Aufhebung dieser Repression durch Anzucht auf nicht reprimierenden Kohlenstoffquellen hat ebenfalls erheblich lebensverlängernde Wirkung. Dieser Befund könnte einen Einstieg in eine detaillierte physiologische Analyse der Seneszenzreaktion bei Podospora ermöglichen; er deutet auf eine wichtige Rolle des Kohlenhydrat- bzw. Energiestoffwechsels bei der Entwicklung der Seneszenz hin.

Aufgrund der möglicherweise zentralen Rolle der Mitochondrien bei diesem wichtigen übergeordneten Regulationssystem (Evans u. Wilkie 1976; Ferrero et al. 1978) könnte dieser Effekt als Parallele zu der Wirkung von Inhibitoren der mitochondrialen Proteinsynthese angesehen werden.

Es ist noch unklar, in welcher Weise die Mitochondrien die Katabolitrepression beeinflussen oder gar steuern; möglicherweise regulieren sie den Gehalt an c-AMP im Cytoplasma (Puglisi u. Algeri 1974).

Über die bisher diskutierte Beteiligung bestimmter Stoffwechselbereiche hinaus konnten einige andere wichtige Erkenntnisse über den Ablauf des Seneszenzvorgangs gewonnen werden,

die bei der Modellbildung berücksichtigt werden müssen:

(1) Hinsichtlich der lebensverlängernden Wirkung von Inhibitoren lassen sich bei Podospora drei Wuchsphasen unterscheiden (Abbildung 13):

- die juvenile Phase, in der Inhibitoren der mitochondrialen Proteinsynthese und nicht-reprimierende Kohlenstoffquellen lebensverlängernd wirken; sie umfaßt etwa die ersten zwei Wochen der Wuchszeit;

- die präsenescente Phase, die sich in morphologischer Hinsicht nicht von der juvenilen unterscheidet; sie entspricht dem Zeitraum zwischen dem "point of no return" für Tiamulin (und Azetat), also der "physiologischen Schwelle", und dem Seneszenzpunkt, der "morphologischen Schwelle". In dieser Phase wirken nur noch DNA-Farbstoffe lebensverlängernd;

- die senescente Phase, die durch die beschriebenen morphologischen Veränderungen charakterisiert ist; in dieser Phase ist keine Lebensverlängerung mehr möglich.

Wie bereits erwähnt (s.o.), hat schon Marcou (1961) die Existenz dreier Wuchsphasen postuliert; dabei soll die zweite Phase, die zeitlich exakt mit der präseneszenten Phase zusammenfällt, durch das Auftreten und die Vermehrung des aktiven infektiösen Prinzips gekennzeichnet sein ("phase d'incubation"). Nach diesen Vorstellungen wäre die physiologische Schwelle mit der "Aktivierung" des infektiösen Prinzips gleichzusetzen.

(2) Die Infektionsversuche an Protoplasten zeigen, daß mit großer Wahrscheinlichkeit das infektiöse Prinzip aus DNA besteht.

Grundsätzlich könnte bei der angewandten Aufarbeitungsmethode auch doppelsträngige RNA in den Extrakten enthalten sein; selbst mit sehr empfindlichen Nachweisverfahren ergaben sich dafür aber keinerlei Hinweise (Lemke, persönl. Mitteilung).

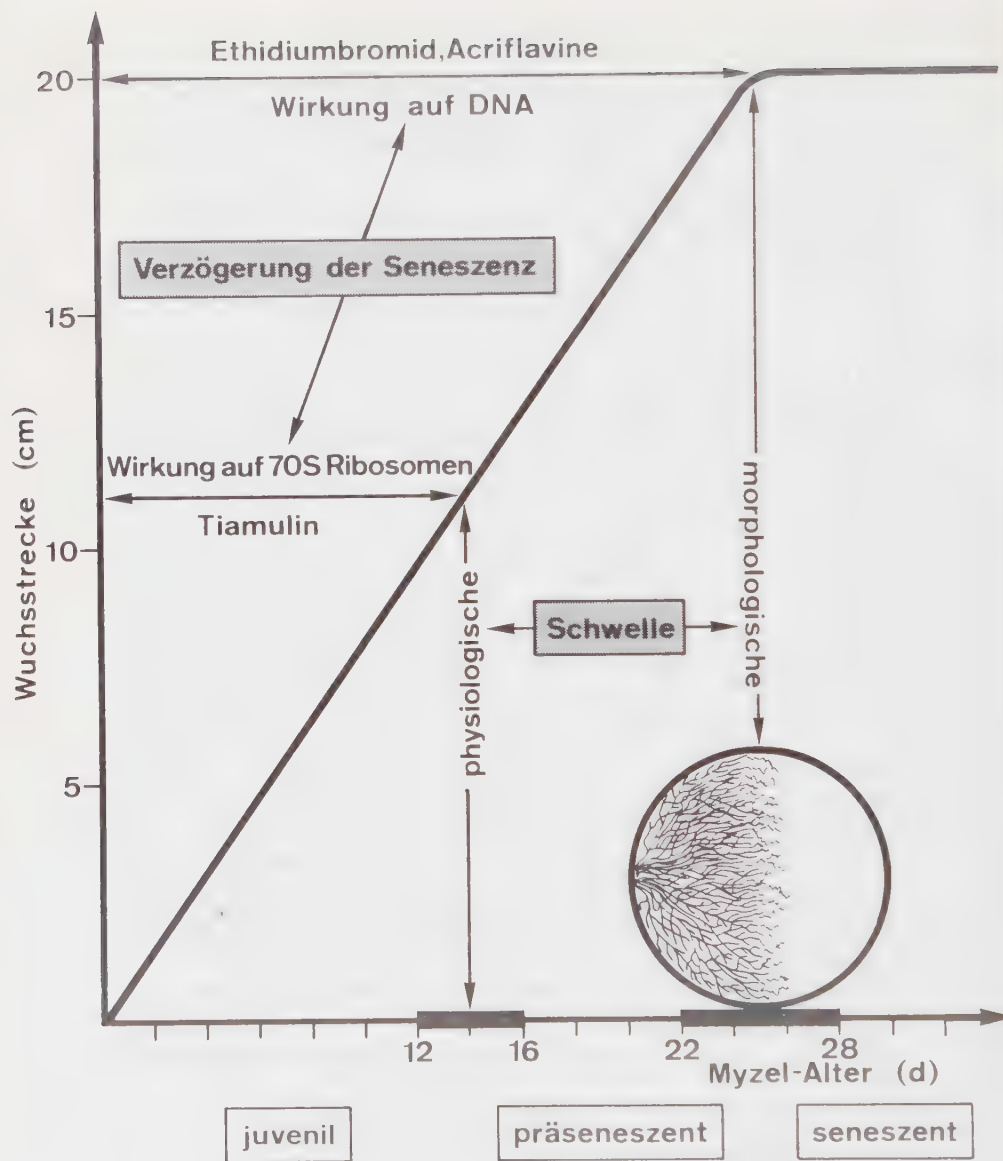


Abbildung 13: Schematische Wuchskurve von *Podospora anserina* mit den durch die Schwellenwerte der beiden Inhibitorgruppen definierten Wachstumsphasen. Einzelheiten im Text.

Hinsichtlich der Art der beteiligten DNA ergeben sich hauptsächlich zwei Möglichkeiten:

a) Mitochondriale DNA ist das infektiöse Prinzip. In diesem Fall müßte man die Existenz zweier verschiedener mt - DNA - Arten postulieren, wobei der für die Ausprägung der Seneszenz verantwortliche Typ besonders empfindlich gegen interkalierende Farbstoffe sein müßte. Die Bildung dieser besonderen DNA-Spezies könnte z.B. durch Mutation erfolgen (die oben erwähnte "Aktivierung"?). Die präsenescente Phase entspräche dann dem Zeitraum, den diese DNA-Art braucht, um die kritische Konzentration zu erreichen; dabei ist allerdings das exakte "Timing" der Seneszenz schwer zu erklären.

Der negative Verlauf der Infektionsversuche mit ganzen Mitochondrien ist nicht unbedingt ein Gegenbeweis: es ist durchaus möglich, daß die "seneszenten" Mitochondrien besonders empfindlich sind und daher bei der Aufarbeitung zerstört werden.

b) Es handelt sich um "freie", Plasmid-ähnliche DNA. Für diese Möglichkeit spricht die Anwesenheit solcher DNA-Moleküle in seneszenten Hyphen (Stahl et al. 1978). Dieses "Plasmid" müßte in der juvenilen Phase in irgendeiner inaktiven Form bzw. Vorstufe existieren (z.B. integriert in die Kern- oder mt-DNA?).

Eine Entscheidung zwischen diesen Alternativen ist im Moment noch nicht möglich. Die Isolation von ausreichenden Mengen an Plasmid- und mt-DNA zur Durchführung von Infektionsversuchen ist bisher noch nicht gelungen.

(3) Eine Heilung konnte bisher mit keiner Methode erreicht werden; allerdings ist eine vorübergehende Juvenilisierung

von Hyphen möglich, z.B. durch Behandlung von präseneszenten Hyphen mit Ethidiumbromid. Es ist also möglich, den Alterungsprozeß bei Podospora anzuhalten und rückgängig zu machen; die eigentliche Ursache, das "Programm", bleibt davon aber unberührt.

In diesem Zusammenhang sind die oben erwähnten Versuche von Marcou und Raynal (1978) interessant: sie konnten zeigen, daß auch die Lebensdauer der verschiedenen Rassen von Podospora cytoplasmatisch determiniert ist. Ob es sich dabei um eine inaktive Vorstufe des infektiösen Prinzips handelt, ist offen.

Eine zusammenfassende Interpretation all dieser Ergebnisse soll auf der Grundlage erfolgen, daß Seneszenz bei Podospora anserina durch ein infektiöses Prinzip verursacht wird, das in zwei Zustandsformen auftritt: einer inaktiven und einer aktiven Form; die letztere vermehrt sich nach ihrer Entstehung bzw. "Aktivierung" rapide in den Hyphen und führt schließlich zum Zelltod.

In Abbildung 14 ist ein hierauf basierendes Modell dargestellt: Das infektiöse Prinzip ist mit großer Wahrscheinlichkeit DNA, entweder mitochondriale oder Plasmid-DNA. Der Übergang in die "aktive" Form, d.h. der Beginn der präseneszenten Phase, wird durch die mitochondriale Proteinsynthese, durch die Katabolitrepression und durch Kerngene gesteuert; zwischen diesen Systemen bestehen enge Wechselbeziehungen. Diese Aktivierung kann durch Inhibitoren der mitochondrialen Proteinsynthese und nicht-reprimierende Kohlenstoffquellen verhindert bzw. erheblich verzögert werden.

Die Vermehrung und Ausprägung des infektiösen Prinzips in der präseneszenten Phase wird durch Kerngene gesteuert bzw.

Infektiöses Prinzip

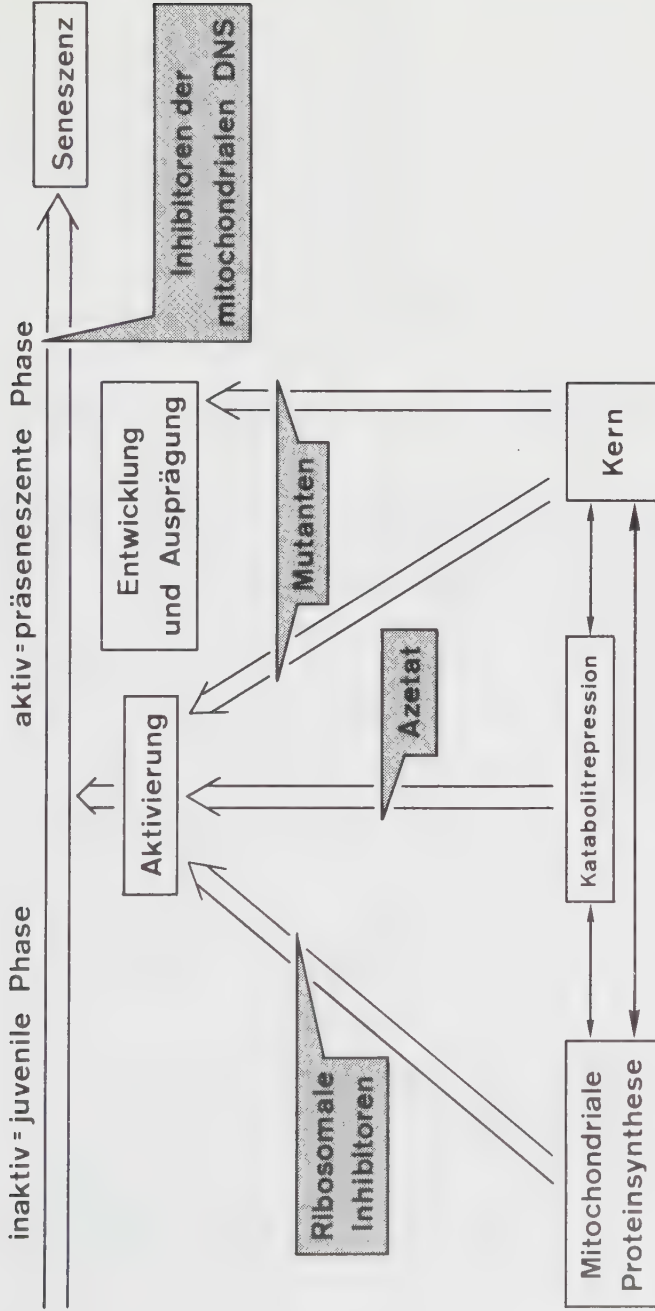


Abbildung 14 : Schematische Darstellung der Entwicklung der Seneszenz bei *Podospora anserina*. Faktoren , die in diesen Ablauf verzögernd oder blockierend eingreifen können (d.h. lebensverlängernd wirken), sind dunkel unterlegt. Einzelheiten im Text.

ermöglicht. Dieser Prozeß läßt sich nur durch Mutationen in nukleären Genen und durch Inhibitoren extrachromosomaler DNA aufhalten.

Offen bleiben dabei letztlich vor allem folgende Punkte:

- die Identität des infektiösen Prinzips;
- die Natur des "aktiven" bzw. "inaktiven" Zustands dieses Prinzips;
- die Rolle der mitochondrialen Proteinsynthese bei dieser Aktivierung;
- die physiologische Wirkung der nukleären Mutanten.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß Seneszenz bei Podospora anserina ein genetisch kontrollierter Prozeß ist, an dem nukleäre und extranukleäre DNA beteiligt sind.

Insofern scheint der Alterungsvorgang dieses Pilzes eine Art Differenzierungsschritt zu sein; zumindest kann nach den jetzt vorliegenden Daten dieses System nicht als eine Bestätigung der Orgelschen Fehlerhypothese angesehen werden (s. im Gegensatz dazu Holliday 1969; s.o.). Allerdings ist die Beteiligung von "Fehlern" (z.B. Mutationen bei der "Aktivierung", s.o.) nicht auszuschließen.

In diesem Zusammenhang stellt sich natürlich die Frage, inwieweit die Seneszenz bei Podospora überhaupt mit der Alterung höherer Organismen vergleichbar ist. Wie bereits erwähnt, lassen sich die Seneszenzsymptome bei Hyphenpilzen recht gut mit den Alterungserscheinungen bei Zellkulturen vergleichen:

(1) Die Zellteilungskapazität dieser Kulturen ist begrenzt und wird offensichtlich genetisch kontrolliert (Hayflick 1969);

- (2) die Alterung einer Zellkultur verläuft in drei Phasen (Hayflick 1961; Bayreuther et al. 1978);
- (3) eine Beteiligung extrachromosomaler Erbinformation (Viren) bei diesem Alterungsprozeß wird diskutiert (Oldstone u. Dixon 1974; Wallace 1974; Bayreuther et al. 1978);
- (4) in älteren Fibroblasten tritt eine Anhäufung des Alterspigments "Lipofuscin" auf (Strehler 1964). Dieses Pigment konnte auch in seneszenten Hyphen von Podospora anserina nachgewiesen werden (Munkrees, persönl. Mitteilung).

Eine Überprüfung der bei Podospora erhaltenen Informationen bei Fibroblastenkulturen wäre daher sehr interessant.

Die Wirkung von Inhibitoren der mitochondrialen Proteinsynthese auf die Lebensdauer von Fibroblastenkulturen wird am National Institute for Medical Research, London, zur Zeit untersucht; Chloramphenikol hat in diesem System keine lebensverlängernde Wirkung (C. Bunn, persönl. Mitteilung).

Aber auch unabhängig von einer Relevanz für die Alterungsforschung ist das Seneszenzsyndrom bei Podospora ein interessantes System cytoplasmatischer Vererbung, mit dessen Hilfe wertvolle Informationen über die Wechselwirkung zwischen nukleärer und extranukleärer DNA erhalten werden können. Sollte sich z.B. bestätigen, daß Plasmid-DNA eine wichtige Rolle bei der Ausprägung der Seneszenz spielt, so wäre dies das erste Eukaryontenplasmid, dem eine Funktion zugeordnet werden könnte.

Im Rahmen dieser Arbeit war eine grundsätzliche Aufklärung des Seneszenzsyndroms bei Podospora zwar nicht möglich, es ist aber wohl gelungen, die Problematik einzugrenzen, exakter zu definieren, und einen ersten Einblick in die molekularen bzw. zellulären Mechanismen dieses Systems zu erhalten.

VI. Zusammenfassung

Seneszenz bei Podospora anserina wird cytoplasmatisch vererbt und durch ein "infektiöses Prinzip" induziert, das durch Anastomosen übertragen werden kann. Es konnte gezeigt werden, daß die Lebensdauer von Podospora-Stämmen mit verschiedenen Verfahren erheblich verlängert werden kann:

(1) durch Eingriffe in das genetische Material : die Analyse von 10 Genen auf 6 Kopplungsgruppen ergab, daß viele Stämme, die Mutationen in je zwei dieser Loci tragen, eine stark erhöhte Lebensdauer haben (teilweise über drei Jahre, gegenüber 25 d beim Wildstamm); vier dieser Gene sind eng gekoppelt. Bei der Doppelmutante i viv konnte die hohe Lebensdauer auf eine passive Immunität gegen das "infektiöse Prinzip" zurückgeführt werden.

(2) durch verschiedene Stoffwechsel-Inhibitoren, die in geringer Konzentration dem Wachstumsmedium zugesetzt wurden: lebensverlängernde Wirkung (bis zu 10 Monaten) haben einige Inhibitoren der mitochondrialen Ribosomen (z.B. Tiamulin, Streptomycin, Puromycin) und interkalierende DNA-Farbstoffe, vor allem solche mit hoher Affinität für mitochondriale (bzw. extrachromosomale) DNA (Acriflavin, Ethidiumbromid). Anhand der Altersabhängigkeit der Wirkung dieser Inhibitoren lassen sich drei Wachstumsphasen bei Podospora unterscheiden: in der "juvenilen" Phase wirken beide Gruppen von Inhibitoren lebensverlängernd, in der (morphologisch identischen) "präseneszenten" Phase , die etwa 10 Tage vor Eintritt der Seneszenz beginnt, wirken nur noch DNA-Inhibitoren, in der "seneszenten" Phase ist keine Lebensverlängerung mehr möglich.

Eine "Heilung" konnte mit diesen Substanzen nicht erreicht werden, die Stämme sterben nach Entzug des Inhibitors früher oder später ab; eine vorübergehende "Juvenilisierung" präseneszenten Hyphen ist aber möglich.

(3) durch Anzucht auf nicht reprimierenden Kohlenstoffquellen: auf Medien mit Azetat, Glycerin, Mellibiose und Raffinose als einziger Kohlenstoffquelle beträgt die Wuchsdauer von Podospora-Myzelien über drei Monate; bei Glukose in hoher Konzentration, bei Laktose und Galaktose tritt keine Lebensverlängerung auf; dabei sind Morphologie und Wuchsrate bei all diesen Medien vergleichbar.

Diese Daten deuten auf eine Beteiligung des Kerns, der mitochondrialen Proteinsynthese, der mitochondrialen DNA (oder anderer extrachromosomaler DNA) und der Katabolitrepression an der Entwicklung der Seneszenz bei Podospora hin. Mit Hilfe eines für dieses System entwickelten Infektiositätstests an Protoplasten konnte wahrscheinlich gemacht werden, daß DNA das infektiöse Prinzip darstellt.

Seneszenz bei Podospora anserina ist also ein genetisch gesteuerter Prozeß, an dem nukleäre und extranukleäre DNA beteiligt sind.

VII. Literaturverzeichnis

- Ainsworth, G.C., Sussman, A.S. : (eds.) The fungi, Vol.II: The fungal organism. Academic Press, New York 1966
- Bandlow, W., Kaudewitz, F.: Action of ethidiumbromide on mt-DNA in the petite - negative yeast Schizosaccharomyces pombe. Molec.gen.Genet. 131, 333 - 338 (1974)
- Barath, Z., Küntzel, H.: Cooperation of mitochondrial and nuclear genes specifying the mitochondrial genetic apparatus in Neurospora crassa. Proc.Nat.Acad.Sc. U.S. 69, 1371 - 1374 (1972)
- Payreuther, K., Buck, T., Kontermann, K., Mollenhauer, J., Rodemann, H.P.: A unifying concept of the molecular mechanisms of the cellular aging and the cellular neoplastic transformation of dividing cells. Abstract. IUBS - Colloquium: Molecular and cellular models of aging. Paris 1978
- Belcour, L.: Cytoplasmic mutations isolated from protoplasts of Podospora anserina. Genet.Res.Cambr. 25, 155 - 161 (1975)
- Belcour, L., Begel, C.: Mitochondrial genes in Podospora anserina : recombination and linkage. Molec.gen.Genet. 153, 11 - 21 (1977)
- Bertrand, H., McDougall, K.J., Pittenger, T.H.: Somatic cell variation during uninterrupted growth of Neurospora crassa in continuous growth tubes. J.gen.Microbiol. 50, 337 - 350 (1968)
- Elaich, R., Esser, K.: Der cis - trans - Positionseffekt in Heterokaryen morphologischer Mutanten bei Podospora anserina. Arch.Microbiol. 68, 201 - 209 (1969)
- Bonanchang, D.U., Scavizzi, M.R., Chabbert, Y.A.: Elimination by ethidiumbromide of antibiotic resistance in enterobacteria and staphylococci. J.gen.Microbiol. 54, 417 - 425 (1969)
- Pozarth, R.F.: Physicochemical properties of double - stranded RNA mycoviruses. in: Viruses and plasmids in fungi, P.A. Lemke, ed., Marcel Dekker, in press
- Pullough, W.S.: Ageing of mammals. Nature 229, 608 - 611 (1971)
- Burgoon, A.C., Bottino, P.J., Motta, J.J.: Uptake of nitrogen fixing blue - green algae Gloeocapsa by protoplasts of tobacco, maize, and Neurospora .(Abstr.) Genetics 83, 12 (1976)

- Campbell, R.C.: Statistics for biologists. Cambridge University Press. London 1967
- Caten, C.E.: Vegetative incompatibility and cytoplasmic infection in fungi. J.gen.Microbiol. 72, 221 - 229 (1972)
- Chevaugneon, J., Digbeu, S.: Un second facteur cytoplasmique infectant chez le Pestalozzia annulata. C.R.Acad.Sci. 251, 3043 - 3061 (1960)
- Clark-Walker, G.D.: Isolation of circular DNA from a mitochondrial fraction from yeast. Proc.Nat.Acad.Sci. U.S. 69, 388 - 392 (1972)
- Comfort, A.: The position of aging studies. Mech.Ageing Dev. 3, 1 - 10 (1974)
- Constabel, F.: Isolation and culture of plant protoplasts. in: Plant tissue culture methods. O.L.Gamborg, L.R.Wetter (edts). National research council of Canada, Ottawa 1975. pp. 11 - 21.
- Cooper, T.G., Beevers, H.: Mitochondria and glyoxisomes from castor bean endosperm. J.Biol.Chem. 244, 3507 - 3513 (1969)
- Cryer, D.R., Eccleshall, R., Marmur, J.: Isolation of yeast DNA. in: Methods in cell biology, D.M.Prescott (edit.), Vol.XII, pp. 39 - 44. Academic Press New York 1975
- Curtis, H.J.: Biological mechanisms of aging. C.C.Thomas, Springfield 1966
- Curtis, H.J.: Genetic factors in aging. Adv.Genet. 16, 305 - 324 (1971)
- D'Agostino, M.A., Nass, M.M.: Specific changes in the synthesis of mitochondrial DNA in chick embryo fibroblasts transformed by rous sarcoma virus. J.Cell Biol. 71, 781 - 794 (1976)
- Danielli, J.F., Muggleton, A.: Some alternative states of amoeba, with special reference to life span. Gerontologia 3, 76 - 85 (1959)
- DeFonbrune, P.: Technique de micromanipulation. Masson et Cie Paris 1949
- Delbrück, M.: in: Unites biologiques douées de continuité génétique. Edition du Centre Nat.Rech.Sci., Paris 1949.pp.25-36
- DeVries, O.M.H., Wessels, J.G.H.: Release of protoplasts from Schizophyllum commune by a lytic enzyme preparation from Trichoderma viride. J.gen.Microbiol. 73, 13 - 22 (1972)

- Diacumakos, E.G., Garnjobst, L., Tatum, E.L.: A cytoplasmic character in Neurospora crassa. J.Cell Biol. 26, 427 - 443 (1965)
- Dowding, E.S.: The sexuality of the normal, giant and dwarf spores of Pleuraea anserina (Ces.) Ventze. Ann.Bot.(London) 45, 1 - 14 (1931)
- Edwards, D.L., Rosenberg, E., Maroney, F.A.: Induction of cyanide - insensitive respiration in Neurospora crassa. J.Biol.Chem. 249, 3551 - 3556 (1974)
- Ephrussi, B., Hootinguer, H., Chimens, A.M.: Action de l'acri-flavine sur les levures. I. La mutation "petite colonie". Ann.Inst.Pasteur 76, 351 - 367 (1949)
- Ephrussi, B., Slonimski, P.P., Yotsuyanagi, Y., Tavlitzki, J.: C.R.Trav.Lab.Carlsberg Ser.Physiol. 26, 87 (1956)
- Esser, K.: Die Inkompatibilitätsbeziehungen zwischen geographischen Rassen von Podospora anserina (Ces.) Rehm. I. Genetische Analyse der Semiinkompatibilität. Z.indukt. Abstamm. u.Vererbungsl. 87, 595 - 624 (1956)
- Esser, K.: Die Inkompatibilitätsbeziehungen zwischen geographischen Rassen von Podospora anserina (Ces.) Rehm. II. Die Wirkungsweise der Semi - Inkompatibilitätsgene. Z.Vererbungsl. 90, 29 - 52 (1959)
- Esser, K.: Podospora anserina. in: Handbook of genetics, vol.I (R.C.King, edit.) Plenum Press New York 1974
- Esser, K., Keller, W.: Genes inhibiting senescence in the ascomycete Podospora anserina. Molec.gen.Genet. 144, 107 - 110 (1976)
- Esser, K., Kuenen, R.: Genetics of fungi. Springer Berlin, Heidelberg, New York 1967
- Esser, K., Minuth, W.: The phenoloxidases of the ascomycete Podospora anserina. VI. Genetic regulation of the formation of laccase. Genetics 64, 441 - 458 (1970)
- Esser, K., Tudzynski, P.: The prevention of senescence in the ascomycete Podospora anserina by the antibiotic Tiamulin. Nature 265, 454 - 456 (1977)
- Evans, I.H., Wilkie, D.: Mitochondrial role in the induction of sugar utilization in Saccharomyces cerevisiae. in: The genetic function of mt. DNA (C.Saccone, A.M. Kroon, eds.) Elsevier Amsterdam 1976

- Fang, M. , Butow, R.A.: Nucleotide reversal of mitochondrial repression in Saccharomyces cerevisiae. Biochem.Biophys. Res.Com. 41, 1579 - 1583 (1970)
- Ferrero, I., Rossi, C., Landini, M.P., Puglisi, P.P.: Role of the mitochondrial protein synthesis in the catabolite repression of the petite - negative yeast Kluyveromyces lactis. Biochem.Biophys.Res.Comm. 80, 340 - 348 (1978)
- Fink, G.R.: A cluster of genes controlling three enzymes in histidine biosynthesis in Saccharomyces cerevisiae. Genetics 53, 445 - 459 (1966)
- Fukuhara, H., Kujawa, C.: Selective inhibition of the in vivo transcription of mt-DNA by ethidiumbromide and by acriflavine. Biochem.Biophys.Res.Comm. 41, 1002 - 1008 (1970)
- Gans, M., Masson, M.: Structure fine du locus ur-I chez Coprinus radiatus. Molec.gen.Genet. 105, 164 - 181 (1969)
- Giles, N.H., Case, M.E., Partridge, W.H., Ahmed, S.I.: A gene cluster in Neurospora crassa coding for an aggregate of five aromatic synthetic enzymes. Proc.Nat.Acad.Sci.U.S. 58, 1453 - 1460 (1967)
- Giles, K.L., Whitehead, H.: Uptake and continued metabolic activity of Azotobacter within fungal protoplasts. Science 193, 1125 - 1126 (1976)
- Goldring, E., Grossmann, L., Krupnik, D., Cryer, D., Marmur, J.: The petite mutation in yeast. Loss of mitochondrial DNA during induction of petites with ethidiumbromide. J.molec.Biol. 52, 323 - 335 (1970)
- Gorini, L., Kataja, E.: Phenotypic repair by streptomycin of defective genotypes in Escherichia coli . Proc.Nat.Acad. Sci.U.S. 51, 487 - 493 (1964)
- Gottlieb, D., VanEtten, J.L.: Changes in fungi with age. I. Chemical composition of Rhizoctonia solani and Sclerotium bataticola. J.Bact. 91, 161 - 168 (1966)
- Gottlieb, D., Molitoris, H.P., VanEtten, J.L.: Changes in fungi with age. III. Incorporation of amino acids into cells of Rhizoctonia solani and Sclerotium bataticola. Arch.Microbiol. 61, 394 - 398 (1968)
- Gottlieb, D., Rahn, K.: Methylation and aging in Rhizoctonia solani . Mycopathologia 60, 57 - 61 (1976)

- Gottlieb, D., Sharma, V.D.: Changes in ribonuclease with age in the fungus Rhizoctonia solani. Mech.Aging Dev. 5, 25-32 (1976)
- Grant, W.D., Poulter, R.T.M.: Rifampicin - sensitive RNA and protein synthesis by isolated mitochondria of Physarum polycephalum. J.molec.Biol. 73, 439 - 454 (1973)
- Green, D.E.: Mechanism of action of uncouplers of mitochondrial energy coupling. Trends in Biochem.Sci. 2, 113 - 116 (1977)
- Handley, L., Caten, C. E.: Vegetative death: a mitochondrial mutation in Aspergillus amstelodami. Heredity 31, 136 (Abstr.)
- Hayflick, L.: The establishment of a line of human amnion cells in continuous cultivation. Exptl.Cell Res. 23, 14 - 25 (1961)
- Hayflick, L.: The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. Exp.Cell Res. 37, 614 - 620 (1965)
- Hayflick, L.: The biology of human aging. Am.J.med.Sci. 265, 433 - 445 (1973)
- Hayflick, L.: Current theories of biological aging. Fed.Proc. 34, 9 - 13 (1975)
- Hemmes, D.E., Hohl, H.R.: Ultrastructural changes and a second mode of flagellar degeneration during aging of Phytophthora palmivora sporangia. J.Cell Sci. 19, 563 - 577 (1975)
- Henry, S.A.: Death resulting from fatty acid starvation in yeast. J.Bact. 116, 1293 - 1303 (1973)
- Hessler, C., Hartmann, G.P.: The two effects of rifampicin on the RNA-polymerase reaction. Biochem.Biophys.Res.Commun. 74, 50 - 56 (1977)
- Hill, B., Franks, L.M.: The mechanisms of aging - there is a programmed limit to lifespan. Trends in Biochem.Sci. 2, 80 - 82 (1977)
- Hixon, S.C., White, W.E., Yielding, K.L.: Selective covalent binding of an ethidium analogue to mitochondrial DNA with production of petite mutants in yeast by photo-affinity labeling. J.molec.Biol. 92, 319 - 324 (1975)

- Hodgin, L.A., Högenauer, G.: The mode of action of pleuromutilin derivatives. Eur.J.Biochem. 47, 527 - 533 (1974)
- Högenauer, G.: The mode of action of Pleuromutilin as compared to Chloramphenicol. In: Topics in infectious diseases, Vol.1 (J.Drews, F.E.Hahn, eds.), pp. 235 - 244. Springer Wien New York 1975
- Holliday, R.: Errors in protein synthesis and clonal senescence in fungi. Nature 221, 1224 - 1228 (1969)
- Holliday, R.: The mechanisms of aging - a build up of errors could be the eventual cause of death. Trends in Biochem. Sci. 2, 80 - 82 (1977)
- Horowitz, N.H.: Biochemical genetics of Neurospora. Adv.Genet. 3, 33 (1950)
- Inoue, H., Ishikawa, T.: Death resulting from unbalanced growth in a temperature - sensitive mutant of Neurospora crassa. Arch.Microbiol. 104, 1 - 6 (1975)
- Jinks, J.L.: Naturally occurring cytoplasmic changes in fungi. C.R. Trav. Lab.Carlsberg Ser. Physiol. 26, 183 - 203 (1956)
- Jinks, J.L.: Lethal suppressive cytoplasm in aged clones of Aspergillus glaucus. J.gen.Microbiol. 21, 397 - 409 (1959)
- Kisiel, M.J., Castillo, J.M., Zuckerman, I.S., Zuckerman, P.N., Himmelhoch, S.: Studies on aging in Turbatrix aceti. Mech.Ageing Dev. 4, 81 - 88 (1975)
- Klercker, J.: Eine Methode zur Isolierung lebender Protoplasten. Öfvers. Kongl.Vetensk.Akad.Förh. No.9, Stockholm (1892)
- Kliejunas, J.T., Ko, W.P.: Continuous versus limited growth of fungi. Mycologia 67, 362 - 366 (1975)
- Kohout, J., Bertrand, H.: Nuclear suppressors of the poky cytoplasmic mutant in Neurospora crassa. I. Genetics and respiratory properties. Canad.J.Genet.Cytol. 18, 311 - 325 (1976)
- Küntzel, H., Parath, Z., Ali, I., Kind, J., Althans, H.: Virus - like particles in an extranuclear mutant of Neurospora crassa. Proc.Nat.Acad.Sci.U.S. 70, 1574 - 1587 (1973)
- Kuraishi, H., Takamura, Y., Mizunaga, T., Uemura, T.: Factors influencing death of biotin deficient yeast cells. J.Gen.Appl.Microbiol. 17, 29 - 42 (1971)

- Levenbook, L., Krishna, I.: Effect of aging on amino acid turnover and rate of protein synthesis in the blowfly Phormia regina. J.Insect.Physiol. 17, 9 - 17 (1971)
- Lewis, C.M., Holliday, R.: Mistranslation and aging in Neurospora. Nature 228, 877 - 880 (1970)
- Lindberg, G.D.: A transmissible disease of Helminthosporium victoriae. Phytopathology 49, 29 - 52 (1959)
- Lloyd, D.: The mitochondria of microorganisms. Academic Press New York 1974
- Lurquin, P.F., Kado, C.I.: Escherichia coli plasmid pBR 313 insertion into plant protoplasts and into their nuclei. Molec.gen.Genet. 154, 113 - 121 (1977)
- Macklin, W.B., Meyer, D.J., Woodward, D.O., Erickson, S.K.: Chloramphenicol - sensitive labelling of protein in microsomes of Neurospora crassa. Nature 269, 447 - 450 (1977)
- Magasanik, B.: Catabolite repression. Cold Spring Harbor Symp.quant.Biol. 26, 249 - 256 (1961)
- Makman, R.S., Sutherland, E.W.: Adenosine-3',5'-phosphate in Escherichia coli. J.Biol.Chem. 240, 1309 - 1311 (1965)
- Marcou, D.: Sur la longevite des souches de Podospora anserina cultivees a divers temperatures. C.R.Acad.Sci.(Paris) 239, 895 - 897 (1954 a)
- Marcou, D.: Sur le rajeunissement par le froid des souches de Podospora anserina. C.R.Acad.Sci. (Paris) 239, 1153 - 1155 (1954 b)
- Marcou, D.: Rajeunissement et arret de croissance chez Podospora anserina. C.R.Acad.Sci.(Paris) 244, 661 - 663 (1957)
- Marcou, D.: Sur la determinisme de la senescence observet chez l'ascomycete Podospora anserina. Proc.X.Intern.Congr.Genet. Vol.II,p.179. Montreal 1958
- Marcou, D.: Notion de longevite et nature cytoplasmique du determinant de la senescence chez quelques champignons. Ann.Sci.Natur.Bot. 11, 653 - 764 (1961)
- Marcou, D., Raynal, A.: Cytoplasmic determinism of longevity and senescence in the fungus Podospora anserina (Abstr.) IUBS colloquium: Molecular and cellular models of aging. Paris 1978

- Marcou, D., Schecroun, J.: La senescence chez Podospora anserina pourrait etre due a des particules cytoplasmiques infectantes. C.R.Acad.Sci.(Paris) 248, 280 - 283 (1959)
- Mattick, J.S., Nagley, P.: Comparative studies of the effect of acridines and other petite - inducing drugs on the mitochondrial genome of Saccharomyces cerevisiae. Molec.gen. Genet. 152, 267 - 276 (1977)
- McCullough, C., Cooke, D., Foxon, J., Sudberry, P., Grant, W.: Nuclear DNA - content and senescence in Physarum polycephalum. Nature 245, 263 - 265 (1973)
- Metzenberg, R.L.: A gene affecting the repression of invertase and trehalase in Neurospora. Arch.Biochem.Biophys. 96, 468 - 474 (1962)
- Molitoris, H.P., VanEtten, J.L., Gottlieb, D.: Altersbedingte Änderungen der Zusammensetzung und des Stoffwechsels bei Pilzen. Proc.Sci.Symp.7.Int.Congr.Mushroom Sci. XIII, 59 - 67 (1968)
- Molitoris, H.P.: Die Laccasen des Ascomyceten Podospora anserina. Bibliotheca Mycologia Band 52.J.Cramer, Vaduz 1976
- Morita, J., Nishida, T., Komano, T.: Effect of polyethylene glycol on transfection of Escherichia coli spheroplasts with bacteriophage x 174 single - stranded and double - stranded DNA-s. Agric. Biol.Chem. 41, 567 - 571 (1977)
- Müller, W., Crothers, D.M.: Studies of the binding of actinomycin and related compounds to DNA. J.molec.Biol. 35, 251 - 290 (1968)
- Munkres, K.D.: Ageing of Neurospora crassa. III. Induction of cellular death and clonal senescence of an inositol-less mutant by inositol - starvation and the protective effect of dietary antioxidants. Mech.Ageing Dev. 5, 163 - 169 (1976 a)
- Munkres, K.D.: Ageing of Neurospora crassa. IV. Induction of senescence in wild type by dietary amino acid analogues and reversal by antioxidants and membrane stabilizers. Mech.Ageing Dev. 5, 171 - 191 (1976 b)
- Obrig, T.G., Gottlieb, D.: In vitro protein synthesis and aging in Rhizoctonia solani. J.Pact. 101, 755 - 762 (1970)

- Okuno, T., Furusawa, I., Hiruki, C.: Infection of barley protoplasts with brome mosaic virus. *Phytopathol.* 67, 610 - 615 (1977)
- Oldstone, M.B.A., Dixon, F.J.: Aging and chronic virus infection: is there a relationship? *Fed.Proc.* 33, 2057 - 2059 (1974)
- Orgel, L.E.: The maintenance of the accuracy of protein synthesis and its relevance to aging. *Proc.Nat.Acad.Sci.U.S.* 49, 517 - 521 (1963)
- Ostroumov, S.A.: Participation of chloroplasts and mitochondria in virus reproduction and the evolution of the eukaryotic cell. *J.theor.Biol.* 67, 287 - 297 (1977)
- Pestka, S.: Inhibitors of ribosome functions. *Ann.Rev.Microbiol.* 25, 487 - 562 (1971)
- Pestka, S.: The use of inhibitors in studies of protein synthesis. in: *Methods in enzymology* (Holowick, W., Kaplan, P., eds.) Vol. XXX, pp. 261 - 282 (1974)
- Picard, M.: Genetic evidence for a polycistronic unit of transcription in the complex locus 14 in *Fodospora anserina*. I. Genetic and complementation maps. *Molec.gen.Genet.* 111, 35 - 50 (1971)
- Picard, M.: Genetic evidence for a polycistronic unit of transcription in the complex locus 14 in *Fodospora anserina*. II. Genetic analysis of informational suppressors. *Genet.Res.(Cambr.)* 21, 1 - 15 (1973)
- Platt, D.: *Biologie des Alterns. Quelle u.Meyer, Heidelberg* 1976
- Polakis, E.S., Bartley, W.: Changes in the enzyme activities of *Saccharomyces cerevisiae* during aerobic growth on different carbon sources. *Biochem. J.* 97, 284 (1965)
- Pontecorvo, G., Roper, J.A., Hemmons, L.M., McDonald, K.D., Bufton, A.W.J.: The genetics of *Aspergillus nidulans*. *Adv.Genet.* 5, 141 - 185 (1953)
- Foulter, R.: Senescence in the myxomycete *Physarum polycephalum*. Ph.D.Diss. Univ. Leicester 1969
- Trillinger, H., Esser, K.: The phenoloxidases of the ascomycete *Fodospora anserina*. XIII. Action and interaction of genes controlling the formation of laccase. *Molec.gen.Genet.* 156, 333 - 345 (1977)

- Printz, D.B., Gross, S.R.: An apparent relationship between mistranslation and an altered leucyl - t-RNA synthetase in a conditional lethal mutant of Neurospora crassa. Genetics 55, 451 - 467 (1967)
- Puglisi, P.P., Algeri, A.A.: in: The biogenesis of mitochondria (A.M.Kroon, C.Saccone, eds.), p.169. Academic Press New York 1974
- Raper, J.R.: Genetics of sexuality of higher fungi. Ronald Press New York 1966
- Reich, E., Franklin, R.M., Shatkin, H.J., Tatum, E.L.: Effect of actinomycin D on cellular nucleic acid synthesis and virus production. Science 134, 556 - 557 (1961)
- Reilly, C., Sherman, F.: Glucose repression of cytochrome a deficient mutants of yeast. Biochem. Biophys. Abstr. 95, 640 (1965)
- Ridgway, C.J., Douglas, H.C.: Unbalanced growth of yeast due to inositol deficiency. J. Bact. 76, 163 - 166 (1958)
- Riedl, K.: Studies on Pleuromutilin and some of its derivatives. J. Antibiotics 29, 132 - 139 (1976)
- Rieske, J.S.: Antimycin A, in: Antibiotics (Gottlieb, D., Shaw, P.D., eds), Vol.1, p. 542. Springer, Berlin, Heidelberg 1967
- Rizet, G.: Sur l'impossibilite d'obtenir la multiplication vegetative ininterrompue et illimite de l'ascomycete Podospora anserina. C.R.Acad.Sci.(Paris) 237, 838 - 855 (1953 a)
- Rizet, G.: Sur la longevite des souches de Podospora anserina. C.R.Acad.Sci.(Paris) 237, 1106 - 1109 (1953 b)
- Rizet, G.: Les modifications qui conduisent a la senescence chez Podospora sont - elles de nature cytoplasmique? C.R.Acad.Sci. (Paris) 244, 663 - 665 (1957)
- Rizet, G., Marcou, D.: Longevite et senescence chez l'ascomycete Podospora anserina. C.R. VII. Congr. intern. Bot. Sect. Vol.10, pp. 121 - 128. Paris 1954
- Roa, R.C., Pose, S.K.: Requirement for cellular protein synthesis in reversal of ethidiumbromide induced inhibition of cell transformation by murine sarcoma virus. Proc.Nat.Acad.Sci.U.S. 72, 4337 - 4340 (1975)

- Ryrie, L.J.: Reconstitution of ATP-exchange by phospholipid addition to the purified oligomycin-sensitive ATP-ase from yeast mitochondria. *Arch.Biochem.Biophys.* 168, 704 - 711 (1975)
- Sachs, L.: *Statistische Auswertungsmethoden*. Springer, Berlin, Heidelberg, New York 1969
- Sager, R.: *Cytoplasmic genes and organelles*. Academic Press, New York, London 1972
- Schatz, G., Mason, T.L.: The biosynthesis of mitochondrial proteins. *Ann.Rev.Biochem.* 43, 51 - 87 (1974)
- Schnarrenberg, C., Deser, A., Tolbert, N.E.: Development of microbodies in sunflower cotyledons and castor bean endosperm during germination. *Plant Physiol.* 48, 566 - 574 (1971)
- Sheng, T.C.: A gene that causes natural death in Neurospora crassa. *Genetics* 36, 199 - 212 (1951)
- Shimada, S., Kuraishi, H., Aida, K.: Unbalanced growth death of yeast due to pantothenate deficiency. *J.Gen.Appl.Microbiol.* 18, 383 - 397 (1972)
- Smith, P.F.: *The biology of mycoplasmas*. Academic Press, New York 1972.
- Smith, J.R., Rubenstein, I.: The development of senescence in Podospora anserina. *J.gen.Microbiol.* 76, 283 - 296 (1973a)
- Smith, J.R., Rubenstein, I.: Cytoplasmic inheritance of the timing of senescence in Podospora anserina. *J.gen.Microbiol.* 76, 297 - 304 (1973 b)
- Sonneborn, T.M.: The relation of autogamie to senescence and rejuvenescence in Iaramecium aurelia. *J.Protocool.* 1, 38-53 (1954)
- Stahl, U.: Zygote formation and recombination between like mating types in the yeast Saccharomycopsis lipolytica by protoplast fusion. *Molec.gen.Genet.* 160, 111 - 113 (1978)
- Stahl, U., Lemke, P., Tudzynski, P., Kück, U., Esser, K.: Evidence for plasmid - like DNA in a filamentous fungus, the ascomycete Podospora anserina. *Molec.gen.Genet.*, in press.
- Strehler, B.L.: On the histochemistry and ultrastructure of age pigment. *Adv.Gerontol.Res.* 1, 343 - 348 (1964)
- Strehler, B.L., Hirsch, G., Gussek, D., Johnson, R., Bick, M.: Codon - restriction theory of aging and development. *J.theor.Biol.* 33, 429 - 443 (1971)

- Subik, J., Behun, M., Smigan, P., Musilek, V.: Mode of action of mucidin, a new antifungal antibiotic produced by the basidiomycete Oudemansiella mucida. Biochem.Biophys.Acta 343, 363 - 370 (1974)
- Sullivan, J.L., Debusk, A.G.: Inositol - less death in Neurospora and cellular aging. Nature New Biol. 243, 72 - 74 (1973)
- Sy, J., Richter, D.: Content of c-AMP and adenylat cyclase in yeast at various growth conditions. Biochemistry 11, 2788 - 2791 (1972)
- Tsai, C., Jain, S.C., Sobell, H.M.: X-ray crystallographic visualization of drug - nucleic acid intercalative binding: structure of an ethidium - dinucleoside - monophosphate crystalline complex. Proc.Nat.Acad.Sci.U.S. 72, 628 - 632 (1975)
- Tsuboi, M., Yanagishima, N.: Effect of c-AMP, Theophylline and caffeine on glucose repression of sporulation in Saccharomyces cerevisiae. Arch.Microbiol. 93, 1 - 12 (1973)
- Tudzynski, P.: Genwechselwirkungen, unter besonderer Berücksichtigung des cis-trans-Positionseffektes bei dem Ascomyceten Podospora anserina. Hausarbeit der Fachprüfung für das Lehramt an Gymnasien. Bochum 1975
- Turner, G.: Cytoplasmic inheritance and senescence. In: The filamentous fungi, Vol.III: Developmental mycology (J.E.Smith, D.R.Berry, eds.). Arnold, London 1978
- VanWijk, R., Konijn, T.M.: C-AMP in Saccharomyces carlsbergensis under various conditions of catabolite repression. FEBS - Lett. 13, 184 - 186 (1971)
- Villanueva, J.R., Acha, J.G.: Production and use of fungal protoplasts. In: Methods in microbiology, Vol. 4 (C.Booth, edit.), pp. 666 - 716. Academic Press, London und New York 1971
- Wallace, D.J.: Aging and RNA - tumor viruses. Clin.Res. 22, 198 - 200 (1974)
- Waring, M.J.: Drugs which affect the structure and function of DNA. Nature 219, 1320 - 1325 (1968)
- Wickner, R.B.: Killer of Saccharomyces cerevisiae: a double-stranded ribonucleic acid. Bact.Rev. 40, 757 - 773 (1976)

- Wickner, R.E.: Deletion of mitochondrial DNA bypassing a chromosomal gene needed for maintenance of the killer plasmid of yeast. *Genetics* 87, 441 - 452 (1977)
- Wickner, R.B., Leibowitz, M.J.: Chromosomal genes essential for replication of double-stranded RNA plasmid of Saccharomyces cerevisiae, the killer character of yeast. *J.molec.Biol.* 105, 427 - 443 (1976)
- Wieland, T.: Struktur und Wirkung der Amatoxine. *Naturwiss.* 59, 225 - 231 (1972)
- Zylber, E., Vesco, C., Penman, S.: Selective inhibition of the synthesis of mitochondrion associated RNA by ethidiumbromide. *J.molec.Biol.* 44, 195 - 210 (1969)
- Zylber, E.A., Perlman, S., Penman, S.: Mitochondrial RNA - turnover in the presence of cordycepin. *Biochem.Biophys. Acta* 240, 588 - 593 (1971)

VIII. Anhang

A. Vorveröffentlichungen

- 1) Esser, K., Tudzynski, F.: The prevention of senescence in the ascomycete Podospora anserina by the antibiotic Tiamulin. Nature 265, 454 - 456 (1977)
- 2) Tudzynski, F., Esser, K.: Inhibitors of mitochondrial function prevent senescence in the ascomycete Podospora anserina. Molec.gen.Genet. 153, 111 - 113 (1977).

B.Lebenslauf

- 28.Januar 1951: geboren in Fluorn/ Krs.Rottweil als Sohn der Eheleute Paul und Elli Tudzynski
- 1956 - 1960: Besuch der Volksschule in Gladbeck/W.
- 1960 - 1969: Besuch des städtischen neusprachlichen Gymnasiums Gladbeck (naturwissenschaftl. Zweig)
- 1965: Eintritt in die evangelisch-freikirchliche Gemeinde Gladbeck/W.
- 1969: Reifeprüfung
- 1969 - 1971: Bundeswehrdienstzeit in Rheine/W.
- 1971 - 1975: Biologie- und Chemiestudium an der Ruhruniversität Bochum
- 1972: Eheschließung mit der Arzthelferin Regina Reinen; zwei Kinder: Melanie (1973), Tobias (1976)
- 1975: 1. Staatsexamen für das Lehramt an Gymnasien im Fach Biologie
- 1976: Erweiterungsprüfung zum 1.Staatsexamen für das Lehramt an Gymnasien im Fach Chemie
- Seit 1.3.1976: wissenschaftlicher Assistent m.d.V.b. am Lehrstuhl für Allgemeine Botanik der Ruhruniversität Bochum. In dieser Zeit Anfertigung der Dissertation unter Anleitung von Prof. Dr. Karl Esser

